

ANNALES  
DE  
**L'INSTITUT PASTEUR**

---

**CONTRIBUTION  
A L'ÉTUDE DU VIRUS DE LA MALADIE D'AUJESZKY**

par P. REMLINGER et J. BAILLY.

(DEUXIÈME MÉMOIRE)

Nous avons, dans un précédent travail (1), donné la liste des espèces animales réceptives ou réfractaires à la maladie d'Aujeszky expérimentale et décrit la symptomatologie si riche de l'affection. Nous avons passé en revue les principaux modes d'infection des animaux et les quelques lésions susceptibles d'être rencontrées aux autopsies. Nous nous proposons d'étudier dans le présent mémoire le siège du virus, ses propriétés biologiques, sa nature, et d'appliquer les notions acquises au diagnostic bactériologique de la maladie.

I. — Siège du virus.

A. — PRÉSENCE DANS LE SANG.

L'existence dans la maladie d'Aujeszky d'une phase sanguine précédant la phase nerveuse est un des nombreux caractères différentiels susceptibles d'être relevés entre cette affection et

(1) Ces *Annales*, t. 52, p. 361-405.

la rage vraie. Cette phase sanguine est particulièrement nette et facile à mettre en évidence chez le lapin.

EXPÉRIENCE 1. — 10 lapins de 1.800 grammes environ sont inoculés dans la chambre antérieure de l'œil avec 3/10 de centimètre cube d'émulsion à 1 p. 50 de virus américain amenant dans ces conditions, la mort en quarante-cinq à cinquante-cinq heures. A partir de la vingt-deuxième heure, on sacrifice successivement les animaux à des intervalles rapprochés et on effectue des passages par le cerveau de lapins neufs avec le sang d'une part, avec la corne d'Ammon d'autre part. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau suivant :

NUMÉRO des lapins	INTERVALLE entre l'inoculation et les passages en heures	ÉTAT DE L'ANIMAL au moment où les passages sont effectués	PASSEAGES	
			Lapin inoculé avec le sang	Lapin inoculé avec l'encéphale
1 . . . .	22	Sacrifié en pleine santé.	+	+
2 . . . .	23	Sacrifié en pleine santé.	+	+
3 . . . .	28	Sacrifié en pleine santé.	+	+
4 . . . .	30	Sacrifié en pleine santé.	+	+
5 . . . .	33	Sacrifié en pleine santé.	+	+
6 . . . .	40	Sacrifié en pleine santé.	+	+
7 . . . .	46	Sacrifié en pleine santé.	+	+
8 . . . .	48	Début de prurit.	+	+
9 . . . .	53	Vient de mourir de la forme pruriginouse.	+	+
10 . . . .	71	Mort depuis 18 heures.	+	+

Ainsi, les passages tout d'abord négatifs avec le sang et la substance nerveuse sont, bien avant l'apparition des premiers symptômes, positifs avec le sang et négatifs avec le cerveau. Dès l'apparition de l'agitation et du prurit, c'est-à-dire dès les premières manifestations cliniques, ils sont positifs à la fois avec le sang et la substance nerveuse. Ces mêmes résultats positifs sont observés avec le sang et le cerveau prélevés immédiatement après la mort ou plus ou moins longtemps après elle sur le cadavre des animaux non plus sacrifiés mais ayant succombé à la maladie elle-même. Enfin, les lapins inoculés avec le sang succombent dans les mêmes délais et avec les mêmes symptômes que les animaux inoculés avec le tissu nerveux.

Ces résultats, qui affectent chez le lapin la régularité d'un schéma, s'observent avec une netteté beaucoup moins grande dans les autres espèces animales. Nous n'avons réussi à mettre

en évidence la virulence du sang qu'une fois sur deux chez la poule, une fois sur trois chez le chat. Chez un épervier, le sang était virulent comme le cerveau, mais l'observation demeurée unique ne permet aucune conclusion sur la fréquence du phénomène. Voici les expériences où un résultat positif a été obtenu.

**EXPÉRIENCE 2.** — On inocule le 20 février 5 cent. cubes d'émulsion épaisse de cerveau de lapin mort du virus américain dans les muscles cruraux d'un chat. L'animal présente dès le 23 février (troisième jour) de l'agitation avec cris de détresse, boiterie du membre inoculé, prurit, hérissement des poils de la queue en brosse à bouteille, etc. L'état s'aggrave le 24 et le 25. Il est sacrifié le 26 à la phase paralytique. 1 cent. cube de sang total prélevé dans le cœur est injecté sous la dure-mère d'un lapin qui, quarante-sept heures plus tard est atteint d'une maladie d'Aujeszky à forme encéphalitique à laquelle il succombe soixante-douze heures après l'inoculation.

2 lapins inoculés sous la dure-mère chacun avec 1 cent. cube d'une suspension d'hématies débarrassées par lavages et centrifugation de toute trace de sérum sont demeurés bien portants. De même, l'inoculation sous-durémérienne de 1 cent. cube de sérum privé de toute hématie par coagulation du sang, a laissé un lapin indifférent.

**EXPÉRIENCE 3.** — Le 28 février, on inocule sous la dure-mère d'une poule une émulsion de cerveau de lapin mort de la maladie d'Aujeszky (virus américain). Le 4 mars (quatrième jour), un violent prurit de la tête se manifeste suivi de troubles de l'équilibre, puis de paralysie. L'oiseau est sacrifié en pleine phase paralytique.

1 cent. cube de sang prélevé dans le cœur est injecté sous la dure-mère d'un lapin qui, cinq jours plus tard, succombe à une maladie d'Aujeszky typique. La vessie ne renfermait pas moins de 110 cent. cubes d'une urine riche en glucose.

Un autre lapin, inoculé dans le cerveau avec une émulsion de la corne d'Ammon de la poule, contracte la forme encéphalitique de la maladie et succombe à la cinquantième heure.

**EXPÉRIENCE 4.** — Un épervier (*Astur nisus L.*), inoculé le 21 septembre sous la dure-mère avec une émulsion de cerveau de lapin mort de la maladie d'Aujeszky (virus hongrois), succombe quatre jours plus tard aux progrès d'une forme paralytique.

Aussitôt après la mort, on recueille du sang dans l'oreillette droite et on l'injecte sous la dure-mère d'un cobaye et d'un lapin aux doses respectives de 3/10 et de 5/10 de centimètre cube. Le cobaye est demeuré bien portant. Le lapin a succombé trois jours plus tard à une forme paralytique bien caractérisée (passages positifs par le cerveau et la chambre antérieure de l'œil du cobaye).

2 lapins et 2 cobayes inoculés avec l'émulsion de l'encéphale de l'épervier sont également morts de la maladie.

Chez le chien, le rat, le cobaye, le hérisson, sacrifiés à la période agonique, le résultat des inoculations du sang a tou-

jours été négatif. De même, le sang de 3 porcelets ne renfermait pas de virus décelable par les inoculations. Chez ces espèces animales, le virus ne demeure certainement pas localisé au point d'inoculation puisque le système nerveux central se montre virulent alors que le sang ne l'est pas. Il est probable que la phase sanguine est précoce, de courte durée et difficile à saisir. On peut aussi se demander si parfois — comme dans la rage — ce n'est pas par l'intermédiaire du système nerveux périphérique que le virus gagnerait le névraxé.

Après avoir déterminé la maladie par inoculation de sang total, nous nous sommes demandé s'il était possible de déterminer l'élément du liquide sanguin sur lequel la virulence était fixée. Les expériences ont porté sur le lapin. La suivante peut être donnée comme type :

**EXPÉRIENCE 5.** — Le 24 mars, on récolte la totalité du sang d'un lapin qui vient de succomber à la maladie d'Aujeszky. On le divise en trois parties destinées à l'étude, respectivement, du sang total, des globules et du sérum.

**1<sup>o</sup> Sang total.** — 1 cobaye reçoit sous la dure-mère 3/10 de centimètre cube de sang total. Il succombe le 27 (troisième jour), à une forme typique de la maladie.

**2<sup>o</sup> Globules.** — Le sang est désébriné par agitation avec des perles de verre et les globules sont débarrassés du sérum par des lavages dans l'eau physiologique suivis de centrifugations. Après une série de sept opérations, on peut admettre l'élimination de toute trace de sérum et on injecte les globules dans la chambre antérieure de 2 lapins (3/10 de centimètre cube à chacun).

L'un d'eux est trouvé mort le troisième jour. Son bulbe inoculé à 2 cobayes, l'un dans le cerveau, l'autre dans l'œil détermine la mort deux et trois jours plus tard. Un lapin inoculé dans la chambre antérieure avec le cerveau de l'un des cobayes présente, après quarante huit heures, la symptomatologie caractéristique de la forme prurigineuse à laquelle il succombe.

Le deuxième lapin inoculé avec les globules sanguins est trouvé mort le quatrième jour au matin avec des lésions caractéristiques de prurit au niveau de l'orbite correspondant à l'œil inoculé. Grande quantité de glucose et d'albumine dans l'urine.

**3<sup>o</sup> Sérum.** — Le sérum sanguin, séparé par coagulation, est injecté le 25 mars à la dose de 3/10 de centimètre cube dans la chambre antérieure et de 1 cent. cube dans les muscles cruraux d'un lapin. L'animal est resté vivant et bien portant.

25 échantillons de sang prélevé dans le cœur peu de temps après la mort ou aussitôt après elle chez des lapins, des chiens, des porcelets, des chats, une poule, un épervier ont fourni 17 résultats positifs, 8 négatifs. Chez 14 lapins, le sang était virulent 13 fois.

Les globules de 9 échantillons de sang (3 lapins, 3 chats, 2 cobayes, 1 chien), atteints de la maladie d'Aujeszky, ont été débarrassés par 6 dilutions dans l'eau physiologique suivies de centrifugations, de toute trace de sérum, puis injectés au lapin ou au cobaye par les voies les plus sévères. Trois résultats positifs ont été fournis par trois échantillons de globules de lapins.

Enfin, parmi 10 lapins et 5 cobayes inoculés dans le cerveau ou dans la chambre antérieure avec des échantillons de sérums recueillis par coagulation spontanée, 1 seul lapin a contracté la maladie. Il avait reçu sous la dure-mère 1/2 cent. cube de sérum du sang d'un lapin recueilli dans le cœur après la mort. Il avait été noté, au moment de l'inoculation, que de minuscules fragments de fibrine mêlés de quelques hématies avaient été aspirés dans la seringue en même temps que le sérum. Cet incident nous a déterminés à effectuer l'expérience suivante :

**EXPÉRIENCE 6.** — Aussitôt après la mort d'un lapin atteint de la maladie d'Aujeszky, on prélève dans le cœur 10 cent. cubes de sang. Abandonné à lui-même, il fournit par coagulation 4 cent. cubes de sérum. Le liquide est complètement débarrassé de toute hématie par centrifugation prolongée à grande vitesse. Une dose de 1 cent. cube de sérum ainsi purifié injecté dans la chambre antérieure et dans les muscles cruraux d'un lapin laisse l'animal indifférent, alors que le culot de centrifugation, formé de quelques fractions de milligramme d'une poussière brune (fragments de fibrine mêlés d'hématies) remis en suspension dans quelques gouttes de sérum et injecté dans la chambre antérieure d'un autre lapin, détermine la mort le troisième jour (passages positifs).

Nous avons, enfin, cherché à serrer le problème d'un peu plus près, à séparer les globules blancs des globules rouges et à déterminer si le virus se fixait sur l'un ou l'autre de ces deux éléments ou sur les deux réunis.

**EXPÉRIENCE 7.** — Le sang d'un lapin à la période agonique est reçu dans un tube à centrifuger renfermant quelques gouttes d'une solution de citrate de soude et on centrifuge longtemps à vitesse modérée. Au terme de l'opération, le tube présente un culot important de globules rouges dans le fond, une couche de plasma clair à la surface et, entre les deux, un mince tapis blanchâtre composé surtout de leucocytes. Cette couche, prélevée avec une fine pipette, est débarrassée le mieux possible d'hématies d'une part, de citrate de soude d'autre part, à l'aide d'une série de lavages et de centrifugations dans l'eau distillée. Le flocon obtenu est inoculé sous la dure-mère d'un lapin. L'animal demeure vivant et bien portant, alors qu'un congénère inoculé avec les hématies contracte la maladie d'Aujeszky.

Des données qui précédent, il résulte que la virulence du sang ne présente pas, dans toutes les espèces animales, la même constance que chez le lapin où elle constitue la règle. Le support de la virulence du sang est constitué, le cas échéant, par les hématies. Les leucocytes et le sérum sont dépourvus de toute activité. La maladie d'Aujeszky ne paraît donc pas transmissible à l'animal sain par les sérum thérapeutiques, ainsi que l'hypothèse en avait été émise lors de l'épidémie de la Hollande méridionale.

Nous devons signaler aussi que la recherche de la formule leucocytaire chez les animaux atteints de la maladie d'Aujeszky n'a donné aucun résultat intéressant. Est-ce en raison de la courte durée de l'affection ? Toujours est-il que cette formule demeure à peu près sans changement depuis l'apparition des premiers symptômes cliniques jusqu'au décès. Le rapport des leucocytes et des hématies n'est pas modifié et il n'y a en particulier aucune hyperleucocytose. On ne trouve à relever qu'une polynucléose tantôt très légère, tantôt plus accusée, mais toujours très banale. Nous avons, chez quelques animaux, constaté, à la fin de la maladie, l'apparition d'hématies nucléées.

#### B. — PRÉSENCE DANS LE SYSTÈME NERVEUX.

Injecté dans un tissu ou dans un organe d'un animal réceptif, le virus de la maladie d'Aujeszky n'y subit, à l'instar du virus de la rage vraie, aucune « éclipse. » (1). Il se multiplie *in situ* de façon continue (le fait est particulièrement facile à suivre dans la chambre antérieure de l'œil du lapin) jusqu'au moment où il passe dans le sang et du sang dans le système nerveux central. Il trouve ici un milieu favorable, se développe abondamment et, c'est avec raison que l'encéphale est employé presque exclusivement pour les passages au cours des recherches expérimentales. La présence du virus dans le système nerveux appelle cependant quelques remarques :

1° Du point d'inoculation le virus ne chemine pas vers les centres, comme le virus rabique, par la voie des nerfs périphériques, mais par les vaisseaux sanguins et lymphatiques.

(1) Ces *Annales*, 43, 1929, p. 1396.

2<sup>o</sup> Il n'est pas exceptionnel que la mort se produise alors que la maladie se trouve encore à la phase sanguine, avant par conséquent, que le virus ne soit parvenu aux centres. D'où les passages négatifs avec l'encéphale alors même que l'animal a succombé à une affection typique. D'où aussi certaines mésaventures dans les envois de cerveaux d'un laboratoire à un autre. Pour cette raison, le virus d'Aujeszky n'est pas un virus qu'on puisse se vanter d'avoir parfaitement en main comme le virus rabique ou la bactéridie charbonneuse. Notons que la faible durée de la maladie (quelques heures seulement) rend ici improbable la possibilité d'une auto-stérilisation.

3<sup>o</sup> Dans l'encéphale, le virus prédomine-t-il dans la substance grise, dans la substance blanche? Est-il plus abondant au niveau de la corne d'Ammon des noyaux optiques basaux, du plancher du 4<sup>e</sup> ventricule? Nous l'ignorons. Aucune recherche n'a encore été effectuée sur ce sujet, et si nous avons pris l'habitude de faire des passages avec la corne d'Ammon, c'est uniquement dans le but d'avoir un point de comparaison invariable dans nos expériences.

4<sup>o</sup> Comme l'encéphale, la moelle épinière renferme le virus dans ses trois segments : lombaire, dorsal, cervical. Du système nerveux central, le virus peut, comme dans la rage, se propager par voie centrifuge aux nerfs périphériques, mais la mort paraît survenir bien plus souvent avant que ces derniers n'aient eu le temps d'être envahis. Nous n'avons trouvé le sciatique virulent que deux fois sur 9 expériences ; le médian a donné un résultat positif et un négatif. Les nerfs du plexus brachial ont fourni un résultat positif et un négatif; le pneumogastrique, un résultat négatif. Voici quelques expériences où les inoculations au lapin d'émulsions de nerfs périphériques ont donné un résultat positif.

EXPÉRIENCE 8. — Présence du virus dans le nerf sciatique. Le 25 mars, une émulsion d'un nerf sciatique de chatte morte de pseudo-rage américaine est injectée à la fois dans la chambre antérieure de l'œil et dans la cuisse droite d'un lapin. Le 29 mars (quatrième jour), l'animal est manifestement pris. Il est trouvé le matin en décubitus latéral, la tête en opistothonus, le cou agité de secousses convulsives. Le membre postérieur droit est le siège d'un vif prurit qui se traduit par des lésions de grattage. Au cours de la journée, l'état du malade s'aggrave rapidement. Mort à 14 heures.

EXPÉRIENCE 9. — Présence du virus dans le nerf médian. Le 25 mars, on

prélève à l'autopsie d'une chatte qui vient de succomber à la pseudo-rage américaine les deux nerfs médians. On les émulsionne finement. Quelques gouttes sont inoculées dans la chambre antérieure d'un lapin, tandis que le surplus est poussé dans les muscles de la cuisse du même animal. Le 27 mars, l'orbite correspondant à l'œil inoculé est le siège d'une sensation de prurit extrêmement vive et, en rapport avec le grattage qui est incessant, il présente une dépilation et une inflammation intenses. L'animal ne tient plus en place et manifeste au cours de la journée une agitation croissante. Il est trouvé mort le 28 au matin. L'urine renferme 40 grammes de sucre par litre.

Passages positifs.

#### EXPÉRIENCE 10. — Présence du virus dans le nerf sciatique.

Un lapin meurt le 2 janvier de pseudo-rage américaine. Les deux nerfs sciatiques sont émulsionnés finement et l'émulsion est inoculée à la dose de 1/2 cent. cube sous la dure-mère et de 2 cent. cubes dans les muscles de la cuisse d'un autre lapin. Le surlendemain — alors que la veille au soir l'animal n'avait attiré l'attention par aucun symptôme — il est trouvé mort « empailé » (1), une bave abondante à la bouche. L'urine renferme par litre 40 grammes de glucose et 0 gr. 75 d'albumine. Passage positif.

### C. — PRÉSENCE DANS LES ORGANES.

Une phase sanguine précédant toujours, dans la maladie d'Aujeszky expérimentale la phase nerveuse, il n'y a pas lieu d'être surpris de ce que les inoculations pratiquées avec les divers organes, donnent fréquemment — et beaucoup plus fréquemment que dans la rage vraie (2) — des résultats positifs. C'est ainsi que nous avons reproduit la maladie avec des pulpes de foie, de rate, de rein, avec le testicule, les capsules surrénales, la moelle osseuse, etc. Une mention spéciale doit être donnée à la présence du virus dans le poumon, présence signalée par Shope dans le « Mad Itch » des États-Unis, lequel ne paraît être qu'une forme de la maladie d'Aujeszky.

#### EXPÉRIENCE 11. — Présence du virus d'Aujeszky dans le testicule.

Le 5 mars, un lapin ayant succombé à la pseudo-rage américaine, un testicule est, aussitôt après la mort, prélevé et émulsionné finement dans l'eau physiologique. 1/2 cent. cube de cette émulsion est inoculé sous la dure-mère d'un autre lapin. Le surlendemain, l'animal présente dès le

(1) Il est extrêmement fréquent dans la maladie d'Aujeszky que la rigidité cadavérique fixe le corps dans la position qu'il avait au moment du décès. Comme celui-ci se produit souvent subitement, l'animal a l'air d'avoir été « empailé » dans une attitude naturelle et pour un peu on le croirait encore vivant. Cette attitude du cadavre est très caractéristique de la paralysie bulbaire. Les passages, dans ces cas, sont toujours positifs.

(2) Ces *Annales*, 47, p. 608.

matin tous les symptômes d'une maladie d'Aujeszky à forme encéphalitique à laquelle il succombe subitement au cours de la journée.

**EXPÉRIENCE 12.** — Présence du virus d'Aujeszky dans la moelle osseuse.

Le 1<sup>er</sup> avril, la moelle fémorale d'un lapin qui vient de succomber à la pseudo-rage américaine est prélevée, émulsionnée dans l'eau physiologique et inoculée à la fois dans la chambre antérieure et dans les muscles de la cuisse droite d'un autre lapin. Le 4 avril (troisième jour), l'animal présente tous les symptômes de la maladie d'Aujeszky à forme prurigineuse la plus caractéristique. L'orbite, l'arcade sourcilière et jusqu'à l'oreille correspondant à l'œil inoculé sont épilés et complètement à vif. L'animal y porte sans cesse les pattes en poussant des cris et en manifestant une vive agitation. Au cours de la journée l'agitation va croissant. Il est sacrifié le soir pour les besoins d'une expérience. Quantité massive de glucose dans l'urine.

**EXPÉRIENCE 13.** — Présence du virus d'Aujeszky dans le poumon.

Le 6 mars, les poumons d'un lapin qui vient de succomber au virus hon-grois sont débarrassés le mieux possible, au moyen de 10 lavages successifs en eau distillée stérilisée du sang qu'ils renferment. Ils sont broyés au Latapie et la pulpe est inoculée dans la chambre antérieure (3/10 de centimètre cube) et aussi dans la cuisse droite (5 cent. cubes) d'un lapin. Le lendemain, l'animal est trouvé mort, la bave à la bouche, l'arcade orbitaire complètement dépilée par le grattage. L'urine renferme 50 grammes de glucose par litre et des traces d'albumine.

La présence du virus dans le tissu pulmonaire peut même être complètement indépendante de celle du sang ainsi que le prouve l'expérience suivante :

**EXPÉRIENCE 14.** — Présence du virus d'Aujeszky dans la pulpe pulmonaire entièrement privée de sang.

Le 7 mars, les lobes pulmonaires d'un lapin atteint de pseudo-rage américaine et sacrifié par saignée sont lavés dix fois consécutives en eau distillée, puis broyés au Latapie. La pulpe obtenue est lavée à son tour et centrifugée en eau distillée jusqu'à ce que l'eau de lavage soit absolument limpide et jusqu'à ce que la réaction de Meyer, recherchée dans cette eau, soit négative. Ce résultat ne demande pas moins de 20 émulsions et centrifugations successives. Le produit obtenu a une apparence pulvérulente blanchâtre. On en injecte à l'aide d'une grosse aiguille le volume d'un grain de blé émulsionné dans 1 cent. cube d'eau physiologique à la fois sous la dure-mère d'un lapin et trois fois plus dans la nuque d'un cobaye. Le lapin présente le 11 mars au matin tous les signes d'une maladie d'Aujeszky à forme paralytique à laquelle il succombe au cours de la journée (passages positifs). Le cobaye est demeuré bien portant.

Au cours d'expériences identiques, mais effectuées exclusivement par inoculation de poumons lavés et centrifugés sous la dure-mère du lapin, des résultats positifs ont été obtenus dans la moitié des cas.

**D. — OU NE TROUVE-T-ON PAS LE VIRUS  
DE LA MALADIE D'AUJESZKY ?**

La salive ne renferme jamais le virus. Recueillie chez les animaux atteints de sialorrhée (phénomène fréquent au cours de la maladie expérimentale) et introduite à la sonde dans l'estomac du lapin, elle se montre inactive, ce que permettait de prévoir le résultat toujours négatif des tentatives de transmission par morsure. Le virus ne se rencontre pas davantage dans la bile. Introduite dans l'estomac à l'aide de la sonde, inoculée dans l'œil ou sous la peau, elle se montre toujours dépourvue de virulence. Chez le lapin, comme chez le cobaye, l'urine introduite dans l'estomac à l'aide de la sonde ou inoculée sous la peau ou dans l'œil ne nous a jamais permis de reproduire la maladie. Quelques auteurs ont été plus heureux. Nous nous demandons si ces résultats ne sont pas dus à la présence dans l'urine d'une petite quantité de sang, présence qui n'est pas rare au cours de la paralysie bulbaire. De fortes doses de matières fécales prélevées soit dans le duodénum, soit dans le gros intestin et après émulsion, introduites à la sonde dans l'estomac du lapin sont toujours restées inactives. Nous n'avons pas rencontré davantage le virus dans l'humeur aqueuse. Quelques expériences entreprises avec le lait ont fourni également un résultat négatif. Un résultat positif a été obtenu avec un lait qui n'avait pas pu être recueilli sans mélange avec une petite quantité de sang.

**II. — Propriétés du virus.****A. — ACTION DE LA DESSICCIATION.**

L'action sur le virus d'Aujeszky des divers facteurs physiques, chimiques ou mécaniques de destruction ou d'atténuation n'a jusqu'ici été l'objet que de très rares recherches. Les données admises sont fragmentaires et parfois dénuées de tout contrôle expérimental, comme le prouve l'épisode suivant : « Le virus de la maladie d'Aujeszky résiste plus de quatre jours et moins de huit jours à la dessiccation » avions-nous lu

dans un traité classique. Nous basant sur cette affirmation, nous avons cru pouvoir commencer la vaccination d'un lot de lapins en injectant sous la peau une émulsion de moelles desséchées durant douze jours sur de la potasse dans des conditions identiques à celles bien connues de la vaccination pastorienne classique. Trois jours après cette injection, les animaux ont commencé à présenter, avec du prurit au point d'inoculation, les symptômes de la maladie d'Aujeszky la plus typique et tous n'ont pas tardé à succomber. Évidemment, l'affirmation sur laquelle nous nous étions appuyés ne reposait pas sur l'observation, mais sur une analogie supposée avec le virus rabique. Cet échec nous a déterminés à étudier l'action sur le virus de la maladie d'Aujeszky de la dessiccation et des autres facteurs d'atténuation.

**EXPÉRIENCE 15.** — Des moelles de lapins ayant succombé à l'affection sont desséchées dans les mêmes conditions que les moelles rabiques, c'est-à-dire dans des flacons de Pasteur, sur de la potasse, à la chambre noire et à la température ambiante ( $+15^{\circ}$  à  $+20^{\circ}$ ). A des intervalles variables, on coupe 1 centimètre de moelle qui est émulsionné dans 5 cent. cubes d'eau physiologique et 0 c. c. 5 de l'émulsion est inoculé sous la dure-mère ou dans la chambre antérieure du lapin. Les résultats sont consignés dans le tableau suivant :

NOMBRE de jours de dessiccation	RÉSULTAT de l'inoculation au lapin	NOMBRE de jours de dessiccation	RÉSULTAT de l'inoculation au lapin
6 . . . . .	+	47 . . . . .	+
7 . . . . .	+	52 . . . . .	+
9 . . . . .	+	55 . . . . .	+
10 . . . . .	+	60 . . . . .	+
11 . . . . .	+	70 . . . . .	+
12 . . . . .	+	80 . . . . .	+
13 . . . . .	+	90 . . . . .	+
14 . . . . .	+	100 . . . . .	+
15 . . . . .	+	110 . . . . .	+
16 . . . . .	+	120 . . . . .	+
17 . . . . .	+	130 . . . . .	+
18 . . . . .	+	140 . . . . .	+
20 . . . . .	+	160 . . . . .	+
22 . . . . .	+	180 . . . . .	+
25 . . . . .	+	186 . . . . .	+
30 . . . . .	+	190 . . . . .	+
33 . . . . .	+	193 . . . . .	+
40 . . . . .	+	200 . . . . .	—
44 . . . . .	+	201 . . . . .	—
45 . . . . .	+	205 . . . . .	—

C'est avec une régularité mathématique que deux ou au plus tard trois jours après l'injection, les lapins inoculés avec des moëlles desséchées de six à cent quatre-vingt-treize jours dans les conditions classiques de la dessiccation des moëlles rabiques prennent la maladie et succombent. On n'observe, après cent quatre-vingt-six, cent quatre-vingt-dix, cent quatre-vingt treize jours, aucun allongement de la période d'incubation, aucune atténuation des symptômes de la période d'état qui permette de supposer que la virulence commence à flétrir. La disparition du pouvoir pathogène paraît ainsi s'effectuer brusquement.

**EXPÉRIENCE 16.** — Le 27 novembre, on inocule sous la dure-mère d'un lapin 3/10 de centimètre cube d'une émulsion de moelle de lapin (virus hongrois) desséchée sur de la potasse depuis le 18 mai, c'est-à-dire depuis cent quatre-vingt-treize jours. Le lendemain, à 9 heures du matin, l'animal est nettement pris. Il attire l'attention par son agitation, l'inquiétude de son regard, le dressement de ses oreilles. L'agitation augmente très rapidement. Le lapin parcourt sa cage sans arrêt. Il répond avec une extrême violence à toutes les excitations et grince continuellement des dents. A 11 heures, on note une légère incertitude de la démarche et on suppose qu'une phase paralytique va succéder à la phase d'agitation, mais l'animal meurt subitement à 12 h. 15, la durée de la maladie déclarée ayant été seulement de trois heures et quinze minutes. L'urine renferme une quantité massive de glucose.

A partir du deux centième jour de la dessiccation, les lapins inoculés ne présentent pas le moindre symptôme morbide et survivent tous avec la plus grande régularité. Nous mentionnerons à titre de comparaison, qu'à l'Institut Pasteur de Tanger, les trépanations effectuées avec des moëlles rabiques (virus fixe), desséchées pendant six et cinq jours dans des conditions identiques à celles des moëlles précédentes, n'ont jamais déterminé la rage. 15 expériences avec des moëlles de quatre jours ont fourni 7 résultats positifs et 8 négatifs. Avec la moelle de trois jours, les résultats ont toujours été positifs. Avec du virus de rue, la mort du lapin a été obtenue avec des moëlles desséchées pendant cinq, six et une fois pendant sept jours. Les résultats fournis par les inoculations des moëlles de huit jours ont toujours été négatifs. On voit combien diffère, à l'égard de la dessiccation, le comportement des virus rabique et pseudorabique.

La résistance du virus d'Aujeszky à ce même facteur d'atténuation, peut encore être mise en évidence au moyen de

l'expérience suivante : une émulsion épaisse de cerveau de lapin ayant succombé au virus hongrois est étalée en couche aussi mince que possible, à la surface d'un verre stérile. Ce verre est placé sous une cloche dont le fond est recouvert d'une épaisse couche de chaux vive. Le tout est mis à l'obscurité et à une température de + 21. À des intervalles variables, on préleve par raclage une petite quantité de la poussière sèche qui représente l'émulsion, on la broie dans de l'eau physiologique et quelques gouttes sont inoculées sous la dure-mère ou dans la chambre antérieure du lapin. Les animaux succombent le lendemain à une maladie d'Aujeszky typique. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

NOMBRE de jours de dessiccation	RÉSULTAT de l'inoculation au lapin	NOMBRE de jours de dessiccation	RÉSULTAT de l'inoculation au lapin
—	—	—	—
10 . . . . .	+	100 . . . . .	+
20 . . . . .	+	150 . . . . .	—
30 . . . . .	+	160 . . . . .	—
80 . . . . .	+		

Ici aussi la disparition de la virulence paraît s'effectuer brusquement. Tout au moins, chez les animaux inoculés avec l'émulsion desséchée sur la chaux pendant cent jours, aucun symptôme ne permettait-il de supposer que la perte de la virulence était proche.

EXPÉRIENCE 17. — Le 8 septembre, 2 lapins sont inoculés l'un dans le cerveau, l'autre dans la chambre antérieure avec une émulsion de virus hongrois étalée en couche mince et desséchée sous une cloche avec de la chaux vive pendant cent jours.

Le lapin inoculé sous la dure-mère présente, dès le lendemain (dix-septième heure), les signes d'une maladie d'Aujeszky à forme paralytique à laquelle il succombe le 10 au matin.

Le lapin inoculé dans la chambre antérieure présente quarante-huit heures plus tard les symptômes de la forme prurigineuse sous son aspect le plus caractéristique. Mort après vingt-quatre heures de maladie.

Il est infiniment probable que les résultats obtenus avec la dessiccation sur la potasse et la chaux seraient identiques si la dessiccation était obtenue au moyen du vide sulfureux. Il est probable également que la résistance offerte par le virus de la maladie d'Aujeszky à la dessiccation joue un rôle important dans l'étiologie de l'affection.

## B. — ACTION DE LA DILUTION.

Nous avons montré antérieurement d'une part, que les dilutions de virus herpétique (souche marocaine) sont inactives à un taux supérieur à 1 p. 10.000 ; d'autre part, qu'on obtient encore avec le virus rabique fixe de l'Institut Pasteur de Tanger comme avec certains virus de rue, des résultats positifs avec des dilutions à 1 p. 300.000, 1 p. 400.000 et même 1 p. 500.000, injectées à la dose de 0 c. c. 5 dans le cerveau du lapin. C'est seulement à partir de 1 p. 600.000 que toutes les dilutions fournissent des résultats négatifs. Autrement dit, et pour employer des unités courantes en bactériologie, 0 c. c. 5 d'émulsion renfermant 1,65, 1,25 et même 1 millième de milligramme de tissu nerveux virulent, confère la rage au lapin. A partir de 0,83 millième de milligramme, les inoculations sont négatives. La dilution a, sur le virus de la maladie d'Aujeszky, une action très voisine de celle qu'il exerce sur le virus rabique, ainsi qu'en témoigne le tableau ci-joint :

TAUX de la dilution	VOLUME INOCULÉ dans le cerveau du lapin en cent. cube	POIDS en millièmes de milligramme	RÉSULTAT de l'inoculation
1/ 50 000 . . . . .	0,5	10	—
1/ 75 000 . . . . .	0,5	6,6	+
1/100.000 . . . . .	0,5	5	+
1/125.000 . . . . .	0,5	4	+
1/150.000 . . . . .	0,5	3,3	+
1/175.000 . . . . .	0,5	2,83	+
1/200.000 . . . . .	0,5	2,5	+
1/400.000 . . . . .	1	2,5	+
1/400.000 . . . . .	0,5	1,25	—
1/500.000 . . . . .	1	2	+
1/500.000 . . . . .	0,5	1	—
1/600.000 . . . . .	0,5	0,83	—

Ainsi, la dilution à 1 p. 500.000 est encore virulente à condition d'être injectée dans le cerveau à la dose non pas de 0 c. c. 5, mais de 1 cent. cube et en poids la dose mortelle s'abaisse jusqu'à 2 millièmes de milligramme. La maladie déterminée chez le lapin par ces dilutions extrêmement faibles, par ces quantités infinitésimales de virus ne diffère en rien de celle qui est causée par les injections massives. L'expérience suivante est très caractéristique à cet égard.

EXPÉRIENCE 18. — Le 6 mai, 3 lapins reçoivent respectivement sous la dure-mère, 1 cent. cube d'une dilution de virus américain à 1 p. 300.000 (3,3 millièmes de milligramme de substance nerveuse virulente) à 1 p. 400.000 (2,5 millièmes de milligramme), à 1 p. 500.000 (2 millièmes de milligramme). Le premier lapin présente, dès le surlendemain, tous les symptômes de la maladie d'Aujeszky : agitation, dyspnée, salivation, puis courses désordonnées et crises encéphalitiques. Le 9, au matin, il est trouvé mort « empaillé ». Le deuxième présente, le 8 au soir, de l'inquiétude, de l'inappétence ; il est également trouvé mort « empaillé » le 9 au matin. Passages positifs. Le troisième n'avait attiré l'attention par aucun symptôme lorsque le 10 mai, au matin (quatrième jour), il est trouvé dans sa cage mort « empaillé », la bave à la bouche. L'analyse de l'urine dénote une quantité massive de glucose et les passages effectués par la chambre antérieure du lapin fournissent un résultat positif (forme prurigineuse caractéristique).

Lorsque l'inoculation ne doit pas être suivie de décès, l'observation la plus minutieuse des animaux inoculés ne permet pas, par contre, l'observation du moindre symptôme morbide.

EXPÉRIENCE 19. — Le 2 mai, 3 lapins reçoivent respectivement, sous la dure-mère, 1/2 cent. cube d'une dilution de virus pseudorabique américain à 1 p. 400.000 (1,25 millième de milligramme de cerveau), à 1 p. 500.000 (1 millième de milligramme), 1 p. 600.000 (0,83 millième de milligramme). Ces 3 lapins examinés plusieurs fois par jour avec le plus grand soin pendant les jours qui ont suivi l'inoculation n'ont jamais montré le moindre symptôme morbide. Ils sont demeurés vivants et parfaitement portants.

#### C. — ACTION DE L'ÉTHER SULFURIQUE.

Si on plonge dans l'éther sulfurique un cerveau de lapin mort du virus rabique fixe, on peut suivre dans l'épaisseur de la substance cérébrale, la disparition graduelle du pouvoir pathogène et pour un encéphale de lapin d'un poids moyen de 8 grammes, fixer à cent vingt, cent vingt-cinq heures le moment où les parties les plus centrales ont perdu leur virulence au point qu'une émulsion à 1 p. 100 inoculée à la dose de 0 c. c. 5 dans le cerveau d'un autre lapin ne provoque aucune manifestation morbide. Pour la dure-mère du cobaye (0 c. c. 20 d'émulsion), ce délai doit être élevé jusqu'à cent trente, cent trente-cinq heures. Les expériences entreprises avec le virus de la maladie d'Aujeszky ont porté seulement sur le lapin. Elles ont montré que ce virus résistait un peu plus à l'éther que le virus rabique. En effet, des cerveaux immersés respectivement cent dix, cent quinze, cent vingt, cent vingt-six, cent vingt-huit-cent quarante-deux heures et inoculés au lapin, soit dans le

cerveau à la dose de 0 c. c. 5 d'une émulsion à 1 p. 50, soit sous la peau à la dose d'un cerveau entier émulsionné dans 50 cent. cubes d'eau physiologique, se sont encore montrés virulents. Il faut que l'immersion soit prolongée cent quarante-cinq heures pour qu'on puisse avoir la certitude que toute virulence est perdue. Les résultats des expériences entreprises par voie sous-dure-mérienne ou sous-cutanée sont consignés dans le tableau suivant :

NOMBRE D'HEURES d'immersion dans l'éther	MODE d'inoculation	RÉSULTAT de l'inoculation
110 . . . . .	Cerveau.	+
115 . . . . .	Cerveau.	+
120 . . . . .	Cerveau.	+
120 . . . . .	Peau.	+
128 . . . . .	Cerveau.	+
128 . . . . .	Peau.	+
130 . . . . .	Cerveau.	-
140 . . . . .	Cerveau.	-
142 . . . . .	Peau.	+
146 . . . . .	Cerveau.	-
146 . . . . .	Peau.	-
150 . . . . .	Cerveau.	-
150 . . . . .	Peau.	-
156 . . . . .	Peau.	-

Pas plus dans l'atténuation par l'éther que dans l'atténuation par dessiccation ou dilution, on n'observe chez les animaux inoculés d'allongement de la période d'incubation ou de la période d'état de nature à faire supposer que la perte de virulence s'effectue progressivement et non brusquement.

EXPÉRIENCE 20. — Le 25 avril, un cerveau de lapin mort de pseudo-rage américaine ayant baigné cent vingt heures dans l'éther, on inocule sous la dure-mère d'un autre lapin, 3/10 de centimètre cube d'émulsion de corne d'Ammon. Le surlendemain, quarante-huit heures exactement après l'inoculation, l'animal présente brusquement les symptômes de la forme encéphalitique la plus caractéristique. Il parcourt sa cage sans arrêt, les oreilles pointées, la bave à la bouche, le regard allumé, grinçant des dents. Cet état d'agitation intense se maintient jusqu'à seize heures. Alors apparaît une paralysie rapidement ascendante. Mort à 17 heures.

Le 25 avril, en même temps que le lapin précédent était inoculé sous la dure-mère, un deuxième lapin recevait sous la peau du flanc, émulsionnée dans 40 cent. cubes d'eau physiologique, la totalité du cerveau. Le surlendemain, alors que la veille au soir il n'avait attiré l'attention par aucune particularité, il est trouvé le matin mort « empaillé » avec des traces d'un prurit violent au niveau des inoculations. Passage positif.

EXPÉRIENCE 21. — Le 3 mai, un cerveau de lapin mort de pseudo-rage américaine ayant baigné cent quarante-deux heures dans l'éther sulfurique, 2 autres lapins reçoivent respectivement sous la dure-mère une émulsion de Corne d'Ammon et, sous la peau, la totalité du cerveau émulsionnée dans 40 cent. cubes d'eau physiologique. Le premier animal n'a montré absolument aucun phénomène pathologique et est demeuré vivant et bien portant. Le second présente brusquement, le 8 mai, cinq jours après l'inoculation, du prurit aux points inoculés, de la dyspnée, de l'inquiétude, puis une agitation croissante. Il meurt subitement à 15 heures. Grande quantité de glucose dans l'urine. Passage positif.

#### D. — ACTION DE LA CHALEUR.

L'action de la chaleur sur les émulsions de virus rabique a été étudiée par de nombreux auteurs. De leurs travaux concordants, il résulte que ces émulsions perdent tout pouvoir pathogène en soixante minutes à 50°, en trente minutes à 60°; en vingt-quatre heures à 45°. Les auteurs classiques disent que les émulsions de virus de la maladie d'Aujeszky ne se comportent pas de façon différente et que le virus est détruit en trente minutes à 60°; en dix minutes à 70°. Dans nos expériences, une émulsion à 1 p. 100 de cerveau de lapin mort de la pseudo-rage était maintenue de trente à cent minutes à l'étuve à 60° et 0 c. c. 5 était injecté chaque fois sous la dure-mère du lapin. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau suivant :

DURÉE de l'exposition à 60° d'une émulsion à 1/100	RÉSULTAT de l'inoculation au lapin
30 minutes. . . . .	+
40 minutes. . . . .	+
45 minutes. . . . .	+
50 minutes. . . . .	-
55 minutes. . . . .	-
60 minutes. . . . .	-
90 minutes. . . . .	-
100 minutes. . . . .	-
120 minutes. . . . .	-

Ainsi, les lapins inoculés avec les émulsions maintenues trente, quarante, quarante-cinq minutes à 60° ont contracté une maladie caractéristique à laquelle ils ont succombé tandis que les animaux ayant reçu des émulsions maintenues à la même température cinquante, cinquante-cinq, soixante, quatre-

vingt-dix minutes sont tous demeurés vivants et parfaitement portants. La perte de la virulence s'effectue brusquement entre la quarante-cinquième et la cinquantième minute. Les lapins inoculés avec l'émulsion chauffée cinquante minutes ne présentent pas le moindre symptôme morbide tandis que les animaux inoculés avec l'émulsion chauffée soit quarante, soit quarante-cinq minutes présentent, après une inoculation minime, tous les symptômes classiques de la maladie.

**EXPÉRIENCE 22.** — Le 10 mai, une émulsion à 1/100 de cerveau de lapin ayant succombé à la pseudo-rage (forme paralytique) est maintenue à l'étuve à 60° pendant deux heures. De la trentième à la cent vingtième minute, des prélèvements sont effectués et des lapins reçoivent chaque fois sous la dure-mère 1/2 cent. cube de l'émulsion. Le lapin qui a reçu 1/2 cent. cube d'émulsion chauffée trente minutes est trouvé mort le surlendemain, la bave à la bouche. Il en est de même du lapin qui a reçu l'émulsion chauffée quarante-cinq minutes. Quarante-huit heures après l'inoculation, son cadavre est trouvé « empaillé », c'est-à-dire dans une attitude caractéristique de la maladie d'Aujeszky. Passage positif. Le lapin qui a reçu l'émulsion chauffée quarante minutes a succombé le troisième jour à une forme encéphalitique classique rendant les passages inutiles. Les lapins inoculés dans des conditions rigoureusement identiques avec des émulsions chauffées cinquante, soixante, soixante-dix minutes, n'ont pas présenté le moindre symptôme morbide et sont demeurés vivants et bien portants.

#### E. — ACTION DE LA GLYCÉRINE.

Tout comme le virus rabique, le virus d'Aujeszky se conserve longtemps en glycérine. Des cerveaux entiers de lapins ayant succombé au virus américain, ou au virus hongrois, sont immersés dans la glycérine stérilisée de flacons pot-bans, maintenus au frigorifique à une température de + 6. A des intervalles convenables, des prélèvements sont effectués au centre de ces cerveaux et les émulsions sont inoculées sous la dure-mère du lapin. Des cerveaux américains ont été ainsi trouvés virulents après cent onze, cent quarante, deux cent un, deux cent soixante-trois, trois cent cinquante-deux, trois cent soixante-six, trois cent quatre-vingts, quatre cent vingt, quatre cent cinquante-quatre jours ; des cerveaux hongrois après quatre-vingts, cent vingt-trois, trois cents, trois cent cinquante, trois cent quatre-vingts, quatre cents, quatre cent quarante, quatre cent soixante-quinze, cinq cent cinq, cinq cent trente-six jours et, avec l'un et comme avec l'autre

virus, la limite supérieure de la conservation paraît bien loin d'avoir été atteinte. Dans des conditions d'expérimentation rigoureusement identiques, nous avons trouvé des cerveaux rabiques encore virulents après six cent trente-sept, six cent cinquante-cinq, six cent quatre-vingt-six, six cent quatre-vingt-dix-sept, sept cent quarante, huit cents, huit cent cinquante, neuf cent un jours. Ici non plus la limite supérieure de la conservation ne paraît pas avoir été atteinte. La comparaison de la durée de la conservation des deux virus paraît du reste susceptible de présenter un certain intérêt. Carini, en effet, a décrit en 1911 une « grande épidémie de rage » qui a sévi pendant plusieurs années dans l'État de Santa Catarina (Sud du Brésil) et fait parmi les bovidés, les chevaux et les mulets des milliers de victimes. La propagation de la maladie par les morsures des chauves-souris était en train de devenir classique, lorsqu'à Buenos-Ayres, Kraüs, Negrette et Kantor, travaillant avec un matériel envoyé par M. Carini lui-même, crurent pouvoir avancer que l'épidémie n'était nullement de nature rabique et qu'il s'agissait de la maladie d'Aujeszky. Carini maintint son diagnostic et une longue polémique s'en suivit. Nous avons émis l'hypothèse que la rage et la pseudorage coexistaient dans les troupeaux de l'Amérique du Sud, qu'un bœuf pouvait succomber à la maladie d'Aujeszky alors qu'il se trouvait en incubation de rage et que le virus rabique était déjà parvenu à son bulbe et à son cerveau. Soit, chez le bœuf, un cas d'infection mixte par les virus rabique et pseudorabique. Les lapins inoculés avec un fragment du bulbe vont, après un très petit nombre de jours, succomber à la seule maladie d'Aujeszky. Le bulbe est immergé en glycérine. Après un temps qui peut être fort long, il est envoyé à un expérimentateur étranger avec, naturellement, l'étiquette de pseudorage. Si le virus de la paralysie bulbaire se conserve en glycérine moins longtemps que le virus rabique, ce n'est pas la maladie d'Aujeszky, mais la rage vraie que l'inoculation du bulbe déterminera peut-être chez le lapin, et voilà la polémique allumée. Cependant, la durée de la conservation du virus d'Aujeszky est-elle bien, ainsi que nous en avons émis l'hypothèse, moins grande que celle du virus rabique ? Plusieurs mois se passeront vraisemblablement avant qu'il ne

nous soit possible de répondre à cette question. Quoi qu'il en soit de ce point particulier, les expériences suivantes sont de nature à montrer que la durée de la conservation du virus d'Aujeszky en glycérine est beaucoup plus longue qu'il n'est classique.

**EXPÉRIENCE 23.** — Un lapin a succombé le 5 mars 1933 à une maladie d'Aujeszky américaine typique. Depuis cette date, le cerveau a été conservé au frigorifique rigoureusement réglé à + 6. Le 2 juin (quatre cent cinquante-quatrième jour), une émulsion est faite avec de la substance nerveuse prélevée au centre de l'organe, et deux lapins sont inoculés, l'un sous la dure-mère, l'autre dans la chambre antérieure de l'œil. Ils succombent, l'un le deuxième jour, l'autre le troisième, à des maladies d'Aujeszky caractéristiques.

**EXPÉRIENCE 24.** — Le cerveau d'un lapin mort de virus hongrois le 13 décembre 1932 a été conservé en glycérine au frigorifique à + 6. Le 2 juin 1934 (cinq cent trente-sixième jour), un prélèvement est effectué au centre de l'organe et l'émulsion inoculée sous la dure-mère d'un premier lapin et dans la chambre antérieure d'un second. Le premier de ces deux animaux présente dès le 4 (deuxième jour) tous les symptômes de la forme encéphalitique la plus caractéristique. Mort subite le soir au cours d'une crise. Le second présente le 5 (troisième jour) une réaction de la région inoculée et tous les symptômes de la forme prurigineuse à laquelle il succombe le jour même.

La durée de la conservation du virus américain est donc de quatre cent cinquante quatre ; celle du virus hongrois de cinq cent trente-six jours au moins. Si quelques auteurs ont obtenu des chiffres inférieurs, cela tient sans doute à ce que les cerveaux n'avaient pas été comme les nôtres maintenus à une température basse (+ 6) et uniformément basse. Il est vraisemblable, en effet, que l'abaissement de la température et sa fixité jouent dans la conservation de la virulence du virus d'Aujeszky le même rôle important que dans la conservation de la virulence rabique.

### III. — Nature du Virus.

#### A. — FILTRABILITÉ.

L'historique du Virus d'Aujeszky n'est pas, comme l'historique du virus rabique, encombré par un grand nombre de microbes visibles auxquels un rôle étiologique a tour à tour

été attribué, puis dénié. Jamais, dans la pseudo-rage, les examens microscopiques, ou les essais de culture, n'ont donné lieu à des méprises.

Le virus a pris place d'emblée parmi les virus filtrants. Zwick et Zeller, puis Bartorelli et Melli lui ont, il est vrai, contesté à un moment ce pouvoir de passer à travers les filtres. Ulérieurement, les expériences de Kraus et Rosenbusch, de Negreite et Kantor, de Zwick lui-même, ont permis de classer définitivement l'agent de la paralysie bulbaire parmi les ultra-virus. Nous n'avons éprouvé, pour notre part, aucune difficulté à faire passer le virus d'Aujeszky à travers les bougies Chamberland L1, L2 et L3 ainsi que le prouvent les expériences suivantes :

**EXPÉRIENCE 25. — Passage à travers Chamberland L1.**

Un cerveau de lapin mort du virus hongrois est émulsionné dans 500 cent. cubes d'eau stérile. On passe sur quatre épaisseurs de gaze pour arrêter les grumeaux et on ajoute une culture en bouillon d'un *Bacterium termo*, isolé des eaux, constitué par de courts bâtonnets extrêmement mobiles et mesurant 1  $\mu$  3 sur 0  $\mu$  5. On ajuste à  $pH = 7,8$  et on fait passer à travers une bougie Chamberland L1 neuve (et dûment éprouvée, dans les conditions physiques suivantes :

Dépression : 18 centimètres de Hg.

Pression atmosphérique : 758.

Température : 20°.

1 cent. cube de mélange est ensemencé avant filtration et 2 cent. cubes après. Le premier ensemencement ayant donné une abondante culture et le second étant demeuré stérile, le filtrat est inoculé à la dose de 1 cent cube sous la dure-mère de 6 lapins. 5 d'entre eux ont succombé le surlendemain à une maladie d'Aujeszky typique. Le sixième est demeuré bien portant.

**EXPÉRIENCE 26. — Passage à travers Chamberland L2.**

Le 7 juin, un cerveau de lapin ayant succombé au virus hongrois est finement émulsionné dans 500 cent. cubes d'eau. L'émulsion est passée à travers quatre épaisseurs de gaze et on ajoute une culture abondante d'un bacille chromogène très fin et très mobile récemment isolé des eaux. On ajuste à  $pH = 7,8$  et on fait passer à travers une bougie Chamberland L2 neuve et dûment éprouvée dans les conditions suivantes :

Débit : 20 cent. cubes à l'heure.

Température : 20°.

Pression barométrique : 760.

Aspiration : 25 centimètres de Hg.

Le filtrat, dont les ensemencements devaient démontrer la rigoureuse stérilité, est inoculé à la dose de 1 cent. cube sous la dure-mère de 6 lapins. Tous ont succombé à des maladies d'Aujeszky complètement typiques.

**EXPÉRIENCE 27. — Passage à travers Chamberland L3.**

Le 11 juin, le cerveau d'un lapin mort de virus hongrois est émulsionné

dans 500 cent. cubes d'eau. On passe à travers quatre épaisseurs de gaze et on ajoute une culture en bouillon d'un *Bacterium termo* isolé des eaux. On ajuste à  $pH = 7,6$  et on fait passer à travers une bougie Chamberland L3 neuve et dûment éprouvée, dans les conditions suivantes :

Aspiration : 30 centimètres de Hg.

Pression barométrique : 760 millimètres.

Température : 21°.

Débit : 30 cent. cubes à l'heure.

Les ensemencements de filtrat, étant demeurés stériles, celui-ci est inoculé à la dose de 1 cent. cube sous la dure-mère de 4 lapins. 2 d'entre eux ont présenté le surlendemain tous les symptômes d'une maladie d'Aujeszky typique à laquelle ils n'ont pas tardé à succomber. Les 2 autres sont demeurés vivants et bien portants.

On sait que les bougies Chamberland L3 ont des pores d'un diamètre approximatif de 2  $\mu$  7 et qu'elles arrêtent le bacille de la diphtérie et les spores du tétanos. Nos expériences cadrent donc bien avec celles de nos prédecesseurs et sont, comme elles, de nature à faire ranger le virus d'Aujeszky parmi les ultra-virus. Ce pouvoir filtrant ne doit pas du reste être exagéré, car si nous avons obtenu des résultats positifs avec Chamberland L1, L2 et L3, nous n'avons pas réussi à faire traverser au virus la bougie Berkefeld V. L'expérience suivante en témoigne.

**EXPÉRIENCE 28.** — L'encéphale d'un lapin ayant succombé au virus hongrois est émulsionné dans 500 cent. cubes d'eau et l'émulsion passée à travers une double épaisseur de gaze. On ajuste à  $pH = 7,6$  par addition d'une petite quantité de bicarbonate de soude à 10 p. 100 et on ajoute une culture en bouillon de *B. termo*. Le tout est passé à travers une bougie Berkefeld V dûment éprouvée et débitant 60 cent. cubes à l'heure dans les conditions suivantes :

Aspiration : 25 centimètres de Hg.

Température : 12°.

Pression atmosphérique : 760.

On recueille 50 cent. cubes de filtrat. Celui-ci est ensemencé en bouillon (résultat négatif) et inoculé à la dose de 1 cent. cube sous la dure-mère de 2 lapins, à la dose de 25 cent. cubes dans les muscles cruraux d'un chat. Ces animaux sont demeurés vivants et bien portants tandis qu'un cobaye inoculé dans la chambre antérieure de l'œil avec 1 goutte de l'émulsion non filtrée a présenté deux jours plus tard tous les symptômes d'une maladie d'Aujeszky à laquelle il n'a pas tardé à succomber.

## B. — ULTRA-FILTRATION.

Le passage du virus d'Aujeszky à travers les bougies Chamberland étant facile à réaliser, il était indiqué de rechercher si ce même virus était capable de traverser les membranes de collodion.

**EXPÉRIENCE 29.** — Une émulsion dans 500 cent. cubes d'eau distillée d'un cerveau de lapin ayant succombé au virus hongrois est dégrossie par filtration sur Chamberland L1. Le filtrat, additionné d'une culture de *Bacterium termo* en eau peptonée est passé à travers une membrane de collodion d'épaisseur moyenne dans les conditions suivantes :

pH : 7,6.

Température : 22°.

Pression : 12 centimètres d'eau.

Pression barométrique : 762 millimètres.

Débit : 3 c. c. 1/2 en cinq heures.

3 lapins reçoivent sous la dure-mère 1 cent. cube chacun de l'ultra-filtrat. Ils sont demeurés vivants et parfaitement portants. Les ensemencements sont restés stériles.

**EXPÉRIENCE 30.** — Le cerveau d'un lapin ayant succombé au virus américain est émulsionné dans 400 cent. cubes d'eau stérile et l'émulsion conservée à la glacière quarante-huit heures, afin de permettre la diffusion du virus dans le liquide. On ajuste à pH = 7,6 après avoir ajouté une culture bien développée de *Bacterium termo*. On fait alors traverser une membrane de collodion épaisse débitant 11 c. c. 7 en sept heures, soit 1 c. c. 7 à l'heure dans les conditions suivantes :

Pression : 15 centimètres d'eau.

Pression atmosphérique : 762 millimètres.

Température : 14°.

Temps de filtration : sept heures.

L'ultra-filtrat est inoculé à la dose de 1 cent. cube sous la dure-mère de 4 lapins, à la dose de 1 goutte sous la dure-mère de 2 souris grises, à la dose de 0 c. c. 75 sous la peau de 3 autres souris. Tous ces animaux sont demeurés vivants et bien portants cependant que les milieux nutritifs ensemencés restaient stériles. Au contraire, les milieux ensemencés avec l'émulsion avant filtration ont donné naissance à un abondant développement de *B. termo* et un lapin inoculé sous la dure-mère avec 2/10 de centimètre cube d'émulsion non filtrée a succombé au bout de deux jours à une maladie d'Aujeszky typique.

**EXPÉRIENCE 31.** — Le 3 novembre, une émulsion à 1 p. 500 de virus autrichien dans l'eau distillée est additionnée d'une culture en bouillon de *B. termo*. On ajuste à pH = 8 et on passe à travers une membrane de collodion dans les conditions suivantes :

Température : 17°.

Volume débité en vingt-quatre heures sous une pression de 25 centimètres d'eau : 20 cent. cubes.

Les ensemencements de l'ultra-filtrat sont demeurés stériles. Celui-ci est inoculé à la dose de 1 cent. cube sous la dure-mère de 3 lapins. Ils sont demeurés vivants et bien portants.

**EXPÉRIENCE 32.** — Une émulsion à 1 p. 500 de virus hongrois dans l'eau distillée, est additionnée d'une culture en bouillon de *Bacterium termo*. On ajuste à pH = 8 et on passe à travers une membrane de collodion débitant 2 c. c. 66 par heure pendant six heures. Température = 19°. Pression : 25 centimètres d'eau. L'ultra-filtrat stérile aux ensemencements) est inoculé

à la dose de 1 cent. cube sous la dure-mère de 6 lapins et de 4 cobayes. Tous sont demeurés vivants et bien portants, ou ont succombé un temps plus ou moins long après l'inoculation à des affections que les passages ont démontré étrangères à la maladie d'Aujeszky.

Nous relevons dans nos cahiers 5 autres expériences ayant porté sur 15 lapins, 5 cobayes et 1 chien où les mêmes résultats négatifs ont été obtenus. Il serait fastidieux de les reproduire. Nous relaterons, par contre, l'épisode suivant, le seul où un résultat positif ait été noté.

**EXPÉRIENCE 33.** — Le 30 mai, une émulsion à 1 p. 500 de virus hongrois est additionnée d'une culture abondante de *Bacterium termo*, formée de bâtonnets courts, extrêmement mobiles, mesurant 1  $\mu$  3 sur 0  $\mu$  5, ainsi que nous l'avons déjà mentionné. On ajuste, à l'aide d'une petite quantité de bicarbonate de soude à pH = 8 et on fait passer le tout à travers une membrane de collodion donnant 4 c. c. 5 à l'heure sous une pression de 20 centimètres d'émulsion. T = 21°. L'ultra-filtrat dont les ensemenements devaient montrer la parfaite stérilité est inoculé à la dose de 1 cent. cube sous la dure-mère d'un lapin, de 1/2 cent. cube sous la dure-mère de 2 autres lapins, de 1/2 cent. cube également dans le cerveau d'un cobaye. Ces 3 derniers animaux sont demeurés vivants et bien portants. Le premier lapin qui, le 2 juin, n'avait attiré l'attention par aucun symptôme est trouvé, le 3 au matin (quatrième jour) mort dans sa cage, les commissures labiales abondamment souillées de vase. L'urine renferme une notable quantité de sucre. Il est fait, avec une émulsion de la corne d'Ammon, un passage par le cerveau d'un premier lapin et par la chambre antérieure d'un second. L'un et l'autre ont succombé respectivement deux et trois jours plus tard à des maladies d'Aujeszky typiques. Le passage du virus à travers la membrane de collodion ne peut ici faire aucun doute.

10 expériences d'ultra-filtration ont, en résumé, fourni 9 résultats négatifs et 1 seul positif. Peut-être serait-il abusif de conclure de façon ferme que, filtrant, le virus de la maladie d'Aujeszky n'est pas ultra-filtrant. Ainsi que le fait justement remarquer M. Hauduroy (1), les résultats fournis par l'ultra-filtration sont susceptibles de varier dans de très larges mesures d'un laboratoire à un autre et nous ne serions nullement surpris si, opérant dans des conditions physiques forcément différentes, d'autres expérimentateurs obtenaient des résultats différents eux aussi.

(1) HAUDUROY. *Les ultra-virus pathogènes et saprophytes*, Paris, 1934. Masson, éd., p. 10 et suiv.

## C. — CENTRIFUGATION.

L'un de nous a montré dès 1903 que, si on soumet à la centrifugation pendant un temps suffisant une émulsion de virus rabique ayant traversé la bougie Berkefeld, la partie la plus superficielle du liquide devient complètement inactive. M. Barratt a réalisé les mêmes expériences avec du virus rabique non filtré. Il a vu que si on soumet à la centrifugation pendant vingt-quatre heures et à raison de 200 tours par minute une dilution de virus à 1 p. 10, le liquide surnageant devient incapable de donner la rage. Nous avons nous-même alors centrifugé avec l'appareil de Kraus et à raison de 1.100 tours par minute des dilutions à 1 p. 50 et 1 p. 100. Alors qu'une demi-heure de centrifugation se montre toujours impuissante à refouler dans le culot la totalité de la substance virulente, le liquide superficiel est, en général, au bout de trois quarts d'heure inoffensif pour le lapin. Au bout d'une heure, l'absence de virulence est la règle (1). Le virus d'Aujeszky s'est comporté d'une façon très différente. Que nous ayons opéré sur des émulsions de substance nerveuse non dégrossies ou, au contraire, ayant déjà traversé une bougie Chamberland très poreuse, nous n'avons jamais — quelles qu'aient été la durée et l'intensité de la centrifugation — réussi à mettre en évidence une différence de comportement entre les parties les plus superficielles du liquide et les parties profondes. Les expériences suivantes prises parmi un grand nombre d'autres toutes semblables prouvent bien le rôle négatif de la centrifugation.

EXPÉRIENCE 34. — Une émulsion à 1 p. 400 de cerveau de lapin ayant succombé au virus hongrois, est filtrée sur papier de manière à retenir les particules solides. Le filtrat est soumis pendant une heure trente à une centrifugation rapide dans la centrifugeuse électrique de Jouan (5.000 tours à la minute) et 4 cobayes reçoivent sous la dure-mère 2/10 de centimètre cube de la partie la plus superficielle ou de la partie moyenne de l'émulsion centrifugée. Tous les animaux ont succombé du deuxième au quatrième jour après l'inoculation à la forme encéphalitique de la maladie.

EXPÉRIENCE 35. — Le 2 novembre, une émulsion de virus hongrois à 1 p. 400 est passée sur deux épaisseurs de gaze pour retenir les grumeaux. Elle est

(1) P. REMLINGER, Action de la centrifugation sur le virus rabique. *Soc. de Biol.*, 7 janv. 1909.

ensuite centrifugée pendant une heure à raison de 5.000 tours par minute au centrifugeur électrique de Jouan. 2 cobayes reçoivent, sous la dure-mère, 0 c. c. 3 du liquide prélevé à la surface des godets. Ils prennent la maladie dans les mêmes conditions que leurs congénères inoculés avec les couches profondes.

**EXPÉRIENCE 36.** — Le 7 juin, le cerveau d'un lapin, ayant succombé au virus américain, a été émulsionné dans 500 cent. cubes d'eau et le mélange, préalablement dégrossi sur 4 épaisseurs de gaze, est passé à travers une bougie Chamberland L1 dans les conditions physiques suivantes :

Température : 21°.

Dépression : 25 cent. cubes de Hg.

Pression barométrique : 762 millimètres, pH = 7,8.

30 cent. cubes sont recueillis en une heure. Le filtrat est centrifugé à la centrifugeuse électrique de Jouan, à raison de 5.000 tours par minute. Après deux heures, la partie superficielle du liquide est inoculée à raison de 0 c. c. 5 sous la dure-mère de 5 lapins. Le fond du godet est injecté à 5 autres lapins, tandis que le liquide des couches intermédiaires est rejeté. Tous les animaux sans exception, ont présenté dans des délais identiques, les premiers symptômes d'une maladie d'Aujeszky typique à laquelle ils ont succombé quelques heures plus tard.

**EXPÉRIENCE 37.** — Le 14 juin, une émulsion dans 500 cent. cubes d'eau d'un cerveau de lapin mort du virus hongrois est passée à travers Chamberland L1. Le filtrat est centrifugé durant deux heures cinquante minutes à raison de 5.000 tours par minute dans la centrifugeuse de Jouan. 2/10 de centimètre cube du liquide sont prélevés, d'une part à la surface, d'autre part au fond du godet et inoculés sous la dure-mère de 2 lapins. Les deux animaux contractent, dans des délais identiques, une affection typique à laquelle ils succombent dans des délais identiques également.

Contrairement aux virus rabique et herpétique, le virus d'Aujeszky ne paraît donc pas sensible à la centrifugation et cette propriété qui l'éloigne des virus précédents le rapproche au contraire du *contagium vivum fluidum*, invoqué par Beijerinck, dans la genèse de la maladie du tabac connue sous le nom de « Mosaïque ».

#### D. — DIFFUSIBILITÉ.

On sait que, si on immerge des cerveaux rabiques ou herpétiques dans du liquide de Locke, de l'eau salée, de la glycérine, si on filtre ces liquides sur papier ou qu'on les inocule au cobaye ou au lapin, on peut conférer à ces animaux la rage ou l'herpès. De même, si on immerge en glycérine, conjointement avec des cerveaux rabiques ou herpétiques, des cerveaux neufs d'animaux réceptifs ou réfractaires, des fragments de

foie, de rein, etc., les virus correspondants passent, de façon non pas constante, certes, mais non rare, dans ces organes, ainsi que le prouvent les inoculations appropriées.

On a pu conclure de là que les virus précités étaient des virus diffusibles, susceptibles de se propager de proche en proche comme le sucre dans un liquide ou la matière colorante dans un tissu. Il était indiqué — étant donné les grandes analogies de ces virus avec celui de la maladie d'Aujeszky — de rechercher si ces mêmes expériences pouvaient être réalisées avec celui-ci.

**1<sup>o</sup> DIFFUSIBILITÉ EN GLYCÉRINE.** — Des cerveaux de lapin ou de chat ayant succombé à la maladie d'Aujeszky : virus américain (souche Ortiz Patto), hongrois (souche d'Aujeszky) ou autrichien (souche Gerlach) sont enlevés avec précaution de façon à éviter les entailles ; ils sont lavés à l'eau distillée stérilisée pour les débarrasser de toute trace de sang puis immersés en glycérine dans des flacons pot-bans et conservés soit à la température ambiante (+ 20), soit à la température du frigorifique (+ 6). Après un nombre de jours qui a varié entre 6 et 162, la glycérine est passée à travers un filtre de papier stérilisé et inoculée à la dose de 10 cent. cubes sous la peau d'un lapin. Presque tous les animaux ont succombé à une maladie d'Aujeszky caractéristique et dont la nature a du reste été démontrée par les passages.

**EXPÉRIENCE 38.** — Le 23 décembre 1932, le cerveau d'un chat mort de la maladie d'Aujeszky est enlevé avec précaution en évitant toute entaille dans la substance nerveuse et conservé dans un pot-ban rempli de glycérine stérilisée, au frigorifique à + 6. Le 15 mai 1933, soit cent quarante et un jours plus tard, on constate que le cerveau est bien complet et sa surface externe bien intacte. Aucune particule solide ne flotte dans la glycérine. Celle-ci est filtrée sur papier et injectée sous la peau du flanc de 2 lapins.

Le 18 mai, dès le matin (troisième jour), le premier de ces animaux est manifestement pris. Il présente un prurit violent et incessant qui l'oblige à porter constamment au niveau du flanc ses dents ou ses pattes. Il parcourt sa cage en tous sens, le regard furieux, les oreilles pointées, et meurt subitement à 14 heures. Les urines renferment une grande quantité de sucre et les passages par le cobaye sont positifs.

Le deuxième lapin présente avec quelques heures de retard sur le précédent une forme prurigineuse également typique. Le 18 mai (troisième jour), vers 14 heures, il commence à s'agiter, à gratter et à mordre ses flancs ; il présente du tremblement, de la dyspnée, de la salivation. Il est trouvé mort empaillé le 19 (quatrième jour) au matin.

EXPÉRIENCE 39. — 1 lapin et 1 cobaye succombent le 4 décembre 1932 à la maladie d'Aujeszky (virus autrichien). Les cerveaux enlevés avec précaution sont immersés dans la glycérine d'un flacon pot ban conservé au frigorifique à + 6. Le 15 mai (cent soixante-deuxième jour), cette glycérine est fi trée sur papier et injectée à la dose de 10 cent. cubes sous la peau du flanc de 2 lapins. L'un de ces animaux est demeuré vivant et bien portant. Le second attire l'attention le 18 (troisième jour) par de l'inquiétude du regard, de l'inappétence et de la dyspnée. Le lendemain, l'état ne présente pas d'aggravation sensible. Le 20 mai (cinquième jour), l'animal est trouvé mort le matin avec des lésions intenses de grattage au point d'inoculation. L'urine renferme des quantités massives de glucose et d'albumine et les passages sont positifs.

Certes, il est possible d'objecter que la glycérine très avide d'eau provoque l'exsudation des liquides aqueux contenus dans le cerveau et que, dans ce mouvement, il y a entraînement de fines particules virulentes et non diffusion à la manière d'une substance soluble. Cependant, si la glycérine est remplacée par du liquide de Locke, les mêmes résultats positifs sont obtenus quoiqu'avec une fréquence moindre en raison de la cause d'erreur qui peut résulter de la putréfaction des organes dans ce milieu.

2<sup>e</sup> PASSAGE DU VIRUS D'UN CERVEAU INFECTIEUX A UN CERVEAU SAIN. — Deux ou trois cerveaux de lapins ayant succombé à la maladie d'Aujeszky sont extraits en prenant soin de ne pas entamer la surface. Ils sont lavés dans une grande quantité d'eau physiologique, puis immersés dans les 30 cent. cubes de liquide de Locke d'un flacon pot-ban. Le cerveau d'un lapin sain est suspendu à l'aide d'un fil dans le sein du liquide, mais sans contact direct avec les cerveaux pseudo-rabiques. Le tout est conservé à 6° et à l'obscurité. Du huitième au onzième jour à partir du début de l'expérience, après plusieurs lavages destinés à enlever les moindres traces du liquide dans lequel l'immersion a été faite, des prélèvements sont effectués avec les parties superficielle, moyenne ou profonde du cerveau sain et des émulsions sont faites qui sont inoculées sous la dure-mère de lapins neufs. A quelques exceptions près, tous les animaux ainsi inoculés contractent la maladie. L'immersion en glycérine donne des résultats identiques à ceux de l'immersion dans le liquide de Locke. Il n'est nullement besoin que le cerveau sain appartienne à la même espèce animale que le cerveau infectieux. Le

virus passe de cerveaux de lapins à cerveaux de cobayes, ou inversement avec la même facilité qu'il passerait de lapin à lapin ou de cobaye à cobaye.

EXPÉRIENCE 40. — Le 16 mai, le cerveau d'un lapin mort de pseudo-rage hongroise est extrait en prenant soin de ne pas entamer la surface. Lavé dans une grande quantité de liquide de Locke, on l'immerge ensuite dans 30 cent cubes du même liquide contenu dans un flacon pot-ban. Le cerveau d'un lapin sain est suspendu à l'aide d'un fil dans le liquide sans contact direct avec le cerveau pseudo-rabique. Le tout est conservé au frigorifique à + 6°. Le lendemain, un nouveau cerveau de lapin (virus hongrois) est immergé dans le même flacon et, le 24 mai (troisième jour), on préleve un fragment d'écorce cérébrale dans la région pariétale du cerveau sain; on lave le fragment à l'eau physiologique, on l'émulsionne et on inocule sous la dure-mère d'un lapin neuf. Le surlendemain, 26 mai, l'animal est trouvé mort empaillé dans sa cage. L'urine renferme une quantité massive de glucose et un passage effectué par le cerveau d'un autre lapin fournit un résultat positif.

EXPÉRIENCE 41. — Le 26 mai, on effectue un prélèvement dans la partie profonde (corne d'Ammon) du cerveau précédent immergé dans du liquide de Locke avec des cerveaux pseudo-rabiques mais sans contact avec eux depuis le 16 (dix jours). L'émulsion est inoculée dans le cerveau d'un lapin. Celui-ci présente dès le surlendemain (28 mai) tous les symptômes d'une maladie d'Aujeszky, à forme paralytique. Il meurt subitement au cours de la journée. L'urine renferme une quantité massive de glucose et les passages par le cerveau d'un autre lapin donnent un résultat positif.

EXPÉRIENCE 42. — Le 18 mai, le cerveau de 2 lapins qui viennent de succomber à la pseudo-rage hongroise sont lavés à l'eau stérilisée pour les débarrasser de toute trace de sang. On les immmerge dans 30 cent. cubes de glycérine contenue dans un flacon pot-ban où a été suspendu — sans contact direct avec les cerveaux précédents — le cerveau d'un lapin sain. Le 27 mai (neuvième jour, on préleve la corne d'Ammon de ce dernier cerveau, on la lave soigneusement à l'eau distillée, on l'émulsionne et on l'inocule sous la dure-mère d'un lapin. Le surlendemain, celui-ci présente tous les symptômes de la maladie d'Aujeszky, à forme encéphalitique la plus typique. Il meurt subitement à 12 heures. L'urine renferme une quantité massive de glucose et un passage par le lapin donne un résultat positif.

**3<sup>e</sup> PASSAGE DU VIRUS DANS DES ORGANES AUTRES QUE LE CERVEAU**  
— Deux ou trois cerveaux de lapins ayant succombé à la maladie d'Aujeszky sont enlevés avec précaution et immérés soit dans du liquide de Locke, soit dans de la glycérine. Dans cette même glycérine ou ce même liquide de Locke on suspend, sans qu'il entre directement en contact avec ces cerveaux, un lobe hépatique de lapin ou de cobaye. Le flacon est conservé à l'obscurité soit à la température ambiante (+ 20°), soit à celle du frigorifique (+ 6°). Après quatre ou cinq jours, le foie est

débarrassé de toute trace de glycérine ou de liquide de Locke par plusieurs lavages au sérum physiologique, des prélèvements sont effectués au centre du parenchyme et des émulsions sont injectées dans le cerveau de lapins neufs. Tous ou presque tous les animaux succombent après deux ou trois jours à une maladie caractéristique dont la nature est du reste démontrée par des passages appropriés.

EXPÉRIENCE 43. — Le 24 mai, deux cerveaux de lapins morts de la maladie d'Aujeszky (virus américain) sont plongés dans les 40 cent. cubes de glycérine stérilisée d'un flacon pot-ban. On suspend dans la même glycérine un lobe hépatique provenant d'un cobaye sain. Quatre jours plus tard un prélèvement est effectué au centre de ce lobe et l'émulsion est inoculée sous la dure-mère d'un lapin. Trois jours plus tard (31 mai), celui-ci succombe à une maladie d'Aujeszky classique. Passages positifs.

Ces expériences pourraient être variées de bien des façons, d'autant que, contrairement à ce qui se passe avec les virus rabique et herpétique, leur réussite est la règle et leur échec l'exception. Avec cette seule différence qu'elle est beaucoup plus facile à mettre en évidence avec le virus d'Aujeszky, la diffusibilité établit ainsi entre les trois maladies une nouvelle analogie. La précaution de laver les cerveaux avant de les immerger ayant toujours été prise avec le plus grand soin, nous croyons qu'il ne s'agit nullement, dans les expériences qui précèdent, d'une simple répartition dans la glycérine d'un virus très tenu provenant soit de la surface de l'encéphale, soit de la section effectuée au collet du bulbe, mais que c'est bien la diffusibilité qui entre en jeu.

#### E. — EXISTENCE D'UNE TOXINE PSEUDO-RABIQUE (?)

Un certain nombre de faits ont été avancés en faveur de l'existence d'une toxine rabique. En faveur d'une toxine pseudo-rabique, on peut faire valoir de même que des lapins ayant reçu sous la peau des cerveaux ayant baigné dans l'éther un temps suffisant pour que le virus soit tué, succombent parfois avec des symptômes rappelant ceux de la maladie d'Aujeszky, mais sans que leur sang, leurs organes, leur système nerveux central soient capables de reproduire la maladie. Cette question appelle toutefois de nouvelles recherches.

\* \* \*

Quelle opinion, étant donné ce qui précède, peut-on se faire de la nature du virus d'Aujeszky? Est-il constitué par un protozoaire à évolution cyclique dont un des stades serait filtrant? par une bactérie extrêmement ténue? par une enzyme? Ces hypothèses doivent, semble-t-il, être pesées en tenant compte à la fois du pouvoir de reproduire la maladie en série, de la filtrabilité, de la diffusibilité et de l'insensibilité à la centrifugation... quatre propriétés dont la réunion est légèrement paradoxale. La diffusibilité éloigne le virus des protozoaires et des bactéries. Elle le rapproche des substances chimiques, susceptibles de se dissoudre, de diffuser dans les liquides. De même, telle une substance chimique en solution, le virus de la paralysie bulbaire n'est pas influencé par la centrifugation. Cependant, une substance chimique dissoute traverse les bougies filtrantes quel que soit le degré de leur resserrement. Le virus d'Aujeszky, au contraire, ne traverse que des bougies d'une porosité déterminée et ceci, comme la propriété de reproduire la maladie en série le rapproche des bactéries. A la fois filtrable, diffusible, non centrifugeable et capable de se reproduire, ne pourrait-il pas, dès lors, être considéré comme un intermédiaire entre les microbes visibles qui se trouvent à la limite inférieure du règne végétal et les diastases, c'est-à-dire des substances colloïdales qu'il n'est peut-être pas interdit de placer à la limite supérieure des corps inorganiques? N'y aurait-il pas là une nouvelle application du vieil adage que la nature ne fait pas de sauts? L'un de nous a déjà soutenu pareille opinion au sujet de la nature du virus rabique et fait remarquer que cette conception du virus de la rage, forme de transition entre les microbes visibles et les colloïdes, diastases ou toxines, se rapprochait du *contagium vivum fluidum* de Beijerinck, mais en différait cependant, un contagion liquide vivant devant passer à travers les bougies, quel que soit leur degré de porosité, et n'être pas influencé par les centrifugations. Deux de ces conditions ne sont pas remplies par le virus rabique; une seule ne l'est pas par le virus

(1) P. REMLINGER, Contribution à l'étude de la nature du virus rabique. *Acad. de Med.*, 12 février 1918.

d'Aujeszky. Celui-ci formerait ainsi un élément de passage entre les bactéries et les diastases particulièrement lent et insensible... Nous ne nous dissimulons du reste nullement toutes les inconnues dont est grevée la question de la nature et de l'origine des ultra-virus et n'avons guère d'autre ambition que d'ajouter une hypothèse à celles qui déjà ont été émises.

#### IV. — Diagnostic bactériologique.

Nous devons maintenant appliquer au diagnostic bactériologique de la maladie d'Aujeszky les notions acquises au cours de cette étude. C'est surtout avec la rage que se pose le diagnostic différentiel de l'affection et dans la grande majorité des cas, c'est le prurit qui fera soupçonner l'existence de la paralysie bulbaire. Comment transformer ce soupçon en certitude? Sans nous arrêter à la question de la virulence du sang et des organes et en nous plaçant surtout au point de vue pratique, nous conseillons de recourir exclusivement à l'inoculation d'une parcelle du bulbe rachidien ou d'une autre portion de l'encéphale sous la dure-mère d'un premier lapin et dans la chambre antérieure de l'œil d'un second. L'inoculation intracranienne — extrêmement sensible — expose à la mort rapide, nocturne, la symptomatologie qui la précède risquant de passer inaperçue. L'inoculation dans la chambre antérieure, au contraire, donne presque toujours lieu — avec un léger retard sur le procédé précédent — à une vive réaction locale, à un prurit orbitaire et périorbitaire des plus caractéristiques et qui s'impose à l'attention de l'observateur le moins averti. Au fond, c'est le procédé de choix. On peut pratiquer l'injection chez le chien, le chat, le cobaye, mais le lapin sera préféré dans l'immense majorité des cas. Il importe toutefois d'insister sur ce que, quels que soient le procédé d'inoculation et l'animal employé, on doit s'attendre avec le virus d'Aujeszky à des morts précoces, voire subites et précédées d'une symptomatologie si atténuée qu'on est tenté d'attribuer le décès à une faute opératoire ou à une affection indépendante de l'inoculation. Presque toujours cette interprétation est injustifiée et c'est bien le virus d'Aujeszky qui est responsable du décès.

Des passages appropriés le démontrent. Pour le praticien qui ne peut pas effectuer lui-même l'inoculation d'un peu de substance nerveuse dans la chambre antérieure d'un lapin, il existe un *modus faciendi* qui est à la portée de tous. C'est celui qui consiste à nourrir un chat avec les organes et tout particulièrement avec le cerveau de l'animal suspect. Si cela même était impossible à réaliser, il n'y aurait qu'à mettre une petite portion du cerveau ou du bulbe dans un flacon de glycérine et à envoyer celui-ci à un laboratoire qualifié.

#### V. — La maladie d'Aujeszky, maladie d'étude et de démonstration.

Nous demandons la permission d'attirer, en terminant, l'attention sur un fait qui ressort nettement de l'étude précédente à savoir que le virus de la maladie d'Aujeszky constitue pour les travaux de bactériologie et de médecine expérimentale un des meilleurs sujets d'étude qui se puisse concevoir. Il peut, en particulier, dans les cours et les exercices pratiques, remplir, pour les organismes ultra-microscopiques, le rôle que joue pour les microbes visibles la bactéridie charbonneuse. Sa supériorité sur les organismes similaires ressort nettement des considérations qui suivent :

1<sup>o</sup> Le virus d'Aujeszky est absolument inoffensif pour l'homme et il peut être mis, sans la moindre appréhension entre les mains de tous les débutants. Von Ratz a publié l'observation de deux garçons de laboratoire qui, s'étant blessés aux mains au cours d'autopsies, eurent des manifestations locales, du prurit en particulier, puis guérirent rapidement. Ces observations sont peu convaincantes. Nous n'avons rien noté de semblable à l'Institut Pasteur de Tanger, où le virus d'Aujeszky est depuis deux ans manié journellement sans précautions spéciales. Plusieurs inoculations accidentelles oculaires ou cutanées, sont demeurées sans le moindre effet, et des injections massives et répétées de substance nerveuse virulente dans le cerveau du singe (*Inuus ecaudatus*) ont été inopérantes.

2<sup>o</sup> Le virus d'Aujeszky est, si on en excepte les animaux à sang froid et certains oiseaux, inoculable à tous les animaux de

laboratoire et tous les procédés d'inoculation lui sont applicables.

3<sup>o</sup> La richesse et la variété de la symptomatologie sont sans égales en médecine expérimentale, cependant que l'intensité et la netteté des manifestations frappent le sujet le moins observateur et le moins averti.

4<sup>o</sup> L'incubation qui, dans des cas exceptionnels, peut ne demander que douze heures ou, au contraire, se prolonger jusqu'à douze jours est pratiquement très courte et très fixe : trente-six à soixante-douze heures.

5<sup>o</sup> L'entretien du virus qui se conserve si longtemps soit à l'état sec, soit enrobé dans la glycérine, ne présente aucune difficulté.

6<sup>o</sup> Un contact étroit entre animaux inoculés et animaux sains dans la promiscuité d'un même box ou d'une même cage n'est susceptible d'amener aucune contagion.

Ces avantages ont, il est vrai, comme contre-partie d'une part, une tendance marquée et assez paradoxale des animaux inoculés à mourir la nuit, d'autre part l'existence de formes rapides et frustes inspirant la crainte d'un accident opératoire ou d'une faute d'asepsie et nécessitant pour enlever ce doute, l'emploi des passages. Ce sont là des inconvénients bien minimes et dont il est même possible de tirer pour l'enseignement un certain bénéfice.

## VI. — Résumé et conclusions.

Les notions acquises dans ce deuxième mémoire peuvent se résumer de la façon suivante :

1<sup>o</sup> Le virus d'Aujeszky se rencontre à la fois dans le sang et le système nerveux central. La phase sanguine de la maladie est particulièrement facile à mettre en évidence chez le lapin. Les inoculations tout d'abord négatives avec le sang et le cerveau sont ensuite positives avec le sang et négatives avec le cerveau, puis positives avec l'un et avec l'autre. Ces résultats schématiques se retrouvent avec moins de netteté dans les autres espèces animales. Dans le sang, le virus ne siège pas dans le sérum, mais dans le plasma où il est fixé sur les hématies et non sur les globules blancs.

2<sup>o</sup> Le virus trouve dans le système nerveux central un milieu très favorable à son développement et c'est avec raison que l'encéphale est presque exclusivement employé pour les passages. A titre exceptionnel, ceux-ci peuvent toutefois être négatifs, le fait étant dû à ce que la mort est survenue avant que le virus n'ait atteint les centres plutôt qu'à un phénomène d'auto-stérilisation. Le virus d'Aujeszky se rencontre moins souvent que le virus rabique dans les nerfs périphériques.

3<sup>o</sup> Les résultats positifs obtenus avec les inoculations de foie, de rate, de testicule, de capsules surrénales, de moelle osseuse sont beaucoup plus fréquents dans la pseudo-rage que dans la rage vraie. Une mention spéciale doit être faite de la présence du virus dans le poumon où elle se manifeste indépendamment même de celle du sang.

4<sup>o</sup> La salive, la bile, l'urine, les matières fécales ne sont jamais virulentes.

5<sup>o</sup> Des moelles de lapins desséchées sur de la potasse, dans des conditions identiques à celles des moelles rabiques, conservent intacte leur virulence pendant cent quatre-vingt-treize jours. La poussière sèche représentant une émulsion de cerveau étalée en couche mince à la surface d'un verre stérile et placée sous une cloche dont le fond est recouvert d'une épaisse couche de chaux est encore virulente après cent jours. Cette résistance extrêmement forte à la dessiccation joue vraisemblablement un rôle important dans l'étiologie de l'affection.

6<sup>o</sup> La dilution à 1 p. 500.000 est encore virulente à condition d'être injectée dans le cerveau du lapin à la dose non pas de 1/2, mais de 1 cent. cube. En poids, la dose mortelle s'abaisse jusqu'à 2/1.000 de milligramme.

7<sup>o</sup> Des cerveaux de lapins immersés de cent dix à cent quarante-deux heures dans l'éther sulfurique se sont encore montrés virulents pour le cerveau et la peau du lapin. Il faut que l'immersion soit prolongée cent quarante-cinq heures pour qu'on puisse avoir la certitude que toute virulence est perdue.

8<sup>o</sup> Les lapins inoculés dans le cerveau avec des émulsions maintenues à 60°, de trente à quarante-cinq minutes, succombent à la maladie, tandis que les animaux ayant reçu des émulsions maintenues à 60° cinquante minutes au moins, demeurent tous vivants et bien portants.

9° Le virus d'Aujeszky se conserve très longtemps en glycérine. Des cerveaux de lapins dûment enrobés et maintenus au frigorifique à + 6° étaient virulents après quatre cent cinquante-quatre jours (virus américain), après cinq cent trente-six jours (virus hongrois) et ces chiffres sont encore loin, selon toute vraisemblance, de représenter la limite supérieure de la conservation.

10° Le virus d'Aujeszky est, comme les virus rabique et herpétique, un ultra-virus. Il traverse les bougies Chamberland L1, L2, L3, mais est arrêté par Berkefeld V. Nous n'avons presque jamais réussi d'autre part à lui faire traverser les membranes de collodion.

11° La centrifugation, quelque rapide et quelque prolongée qu'elle soit, demeure sans effet sur les émulsions et sur les filtres de virus de la pseudo-rage.

12° La diffusibilité du virus d'Aujeszky est supérieure à celle des virus rabique et herpétique. C'est avec la plus grande facilité que le virus de la pseudo-rage passe dans la glycérine, le liquide de Locke, qu'il se propage dans des cerveaux d'animaux neufs et même dans du foie, du rein, etc.

13° Les propriétés paradoxales du virus d'Aujeszky l'apparentent au *contagium vivum fluidum* de Beijerinck et posent la question de savoir si on ne peut pas le considérer comme un intermédiaire entre les microbes visibles et les diastases,

14° Le lapin et le chat sont des animaux de choix pour le diagnostic bactériologique de la maladie. Chez le lapin, on peut employer l'inoculation intracranienne extrêmement sensible, mais exposant à une mort rapide ou nocturne, et l'inoculation dans la chambre antérieure de l'œil qui donne lieu presque toujours à une symptomatologie très caractéristique. Le chat sera nourri avec les organes et tout particulièrement avec le cerveau de l'animal suspect.

15° Le virus de la maladie d'Aujeszky constitue pour les travaux de bactériologie et de médecine expérimentale un excellent sujet d'études. Dans les cours et exercices pratiques, il peut remplir pour les organismes ultra-microscopiques le rôle que joue pour les microbes visibles la bactéridie charbonneuse ou la pasteurella aviaire.

## RECHERCHES SUR LA PARALYSIE DIPHTÉRIQUE EXPÉRIMENTALE

par le Dr G. RUELLE.

(*Travail du laboratoire d'hygiène de l'Université de Bruxelles.*)

Quelques observations ont permis de se rendre compte que, chez l'homme, la paralysie post-diphétique tardive et d'évolution lente s'accompagne de la production d'antitoxine. Ramon, Debré et Uhry [1] l'ont rappelé récemment. Gengou et Cohen [2] en ont rapporté un bel exemple. Chez un enfant présentant des troubles de la marche après une angine dont la nature n'avait pas été identifiée, le sang contenait 2,1 unités antitoxiques par centimètre cube.

Uhry, dans sa thèse [3], rapporte l'histoire de quelques enfants atteints de paralysie post-diphétique. Chez ces petits malades, il a noté, par centimètre cube de sérum : chez le premier, 3 unités antitoxiques au vingtième jour; chez le deuxième, 2 unités antitoxiques; chez le troisième, 15 unités antitoxiques; chez le quatrième, 12 unités antitoxiques. Kleinschmidt, d'après Uhry, a également constaté la présence d'un excès d'antitoxine dans le sérum de deux malades atteints de paralysie diphétique peu de jours avant leur mort. Mais il semble bien que, dans les cas d'Uhry et de Kleinschmidt, il s'agissait d'enfants injectés de sérum antidiphétique. Les observations démonstratives de l'apparition spontanée d'antitoxine chez les sujets atteints de paralysie diphétique restent donc encore bien rares.

\* \* \*

Nous avons cru intéressant d'étudier la production de l'antitoxine par l'animal chez lequel on provoque expérimentalement une paralysie diphétique. Jusqu'à l'année dernière, il eût été impossible de faire cette recherche. On connaissait, à vrai dire,

les expériences de Roux et Yersin. Ces auteurs, en faisant au lapin une injection intraveineuse de culture diphtérique ou de toxine, ont observé, le plus souvent, la mort de l'animal en quatre jours. La courte maladie se terminait par une paralysie généralisée précédant de très peu la mort. Toutefois, chez certains animaux résistant plus longtemps, la paralysie apparaissait entre le deuxième et le neuvième jour, frappant les deux membres postérieurs pour prendre ensuite le type de la paralysie ascendante de Landry.

Babonneix a réussi, ultérieurement, à créer des paralysies au point d'inoculation. Une injection sous-cutanée de quelques gouttes de toxine dans la patte d'un lapin détermine la paralysie de celle-ci. La monoplégie ne s'étend ensuite que très lentement pour se généraliser plus tard.

Cependant, ainsi que le fait remarquer Rist, d'après Ramon, Debré et Uhry [4], ces expériences ne peuvent être comparables aux constatations de la clinique. « La période d'incubation est très courte, quelques jours au plus, alors que, chez l'homme, le délai d'apparition oscille entre dix et vingt-cinq jours et est même parfois plus long. D'autre part, la paralysie humaine est le plus souvent parcellaire, incomplète et n'entraîne la mort que dans un nombre restreint de cas. »

Aussi faut-il savoir gré à Ramon, Debré et Uhry [4] de nous avoir dotés du moyen d'étudier plus facilement et plus complètement, par voie expérimentale, les problèmes que soulève la paralysie diphtérique.

Après de multiples essais, ces auteurs se sont adressés à une toxine dont l'activité a été réduite par l'addition de formol (4,35 p. 1.000) et par un séjour de vingt-deux heures seulement à 37°. Cette toxine, ainsi traitée, tue le cobaye de 280 grammes à la dose de 1/8 de centimètre cube en quatre à cinq jours. Les expériences ont porté sur trois espèces animales : le cobaye, le lapin et le chien.

Nos recherches personnelles, dont on trouvera plus loin l'exposé, nous ont permis d'observer la succession des phénomènes de paralysie tels qu'ils ont été décrits, chez le cobaye, par Ramon, Debré et Uhry [4] qui s'expriment comme suit :

« Si l'on injecte, dans les muscles de la patte postérieure droite d'un lot de cobayes de 280 à 300 grammes environ, 1/20

de centimètre cube de la toxine préparée comme il vient d'être dit, on observe vers le quinzième jour au plus tôt chez les uns, vers le vingtième ou le vingt-cinquième jour, parfois plus tard encore, chez les autres, les premiers symptômes de paralysie du membre au niveau duquel on a pratiqué l'injection. Au repos, la patte postérieure droite est en extension, légèrement déjetée de côté; chez l'animal en mouvement, elle conserve, le plus souvent, cette position, la face plantaire regardant vers le haut. Cette paralysie, d'abord locale, s'étend progressivement. La paralysie se généralise, l'impuissance devient absolue, au point que la nourriture doit être mise à la portée de l'animal.

Les troubles cardio-pulmonaires, la dyspnée, la tachycardie apparaissent; le cobaye reste couché sur le flanc et la mort survient par syncope ou asphyxie dans un délai qui varie entre trente-cinq et quarante jours. »

#### RECHERCHES PERSONNELLES.

Utilisant la technique imaginée par Ramon, Debré et Uhry, pour l'obtention de la paralysie diptérique expérimentale, nous nous sommes proposés de rechercher l'existence éventuelle d'antitoxine dans le sérum de cobayes, soit au début, soit pendant l'évolution de leur paralysie. Nos recherches étaient en cours quand Ramon, Debré et Uhry [4] ont relaté les résultats de leurs expériences sur la paralysie diptérique expérimentale. Ces auteurs, dans leur travail, signalent, en effet, d'une façon cependant un peu sommaire, que l'injection au cobaye d'une quantité de toxine modifiée, suffisante pour provoquer l'apparition, après quinze jours, trois semaines, d'une paralysie nette, est néanmoins suivie de la production d'antitoxine qui peut atteindre 1/10 d'unité antitoxique par centimètre cube de sérum au moment où s'installe la paralysie.

Grâce à la toxine qu'a bien voulu mettre à notre disposition M. Ramon, nous avons pu très facilement créer des paralysies chez le cobaye. Nous avons recherché tout d'abord si la dose de toxine injectée exerce une influence sur la longueur du délai d'installation de la paralysie, sur l'intensité de celle-ci, ainsi que sur le taux d'antitoxine présente dans le sang au moment

de l'apparition de ces troubles. Le tableau suivant montre la relation entre la dose de toxine modifiée et la durée du délai d'installation de la paralysie.

DOSAGE de toxine en cent. cube	DATES	DÉBUT de la paralysie	PARALYSIE nette	DURÉE d'incubation en jours	OBSERVATIONS
1/5	31 janv. 1934.	5 fév. 1934.	9 fév. 1934.	10	Mort des 2 cobayes le 24 février 1934.
1/8	31 janv. 1934	3 fév. 1934.	7 fév. 1934.	8	Mort du 1 <sup>er</sup> cobaye le 21 février 1934.
1/10	31 janv. 1934.	5 fév. 1934.	9 fév. 1934.	10	Mort du 2 <sup>e</sup> cobaye le 23 février 1934.
1/12,5	31 janv. 1934.	5 fév. 1934.	9 fév. 1934.	10	Mort du 1 <sup>er</sup> cobaye le 25 février 1934.
1/16	31 janv. 1934.	5 fév. 1934.	9 fév. 1934.	10	Mort du 2 <sup>e</sup> cobaye le 28 février 1934.
1/20	31 janv. 1934.	5 fév. 1934.	12 fév. 1934.	13	Les 2 cobayes résistent.
1/30	10 avril 1934.	18 avril 1934.	?		Les 2 cobayes résistent.
1/50	10 avril 1932.	20 avril 1934.	?		Les paralysies sont à peine marquées.
1/100	10 avril 1932.	20 avril 1934	?		Paralysies très légères.
					Parésies.

Nos résultats confirment ceux de Ramon, Debré et Uhry en ce qui concerne l'influence de la dose de toxine injectée sur la date d'apparition de la paralysie, son intensité, son évolution et le sort final des animaux.

L'apparition des symptômes paralytiques s'observe après le même délai pour des doses de toxine variant entre 1/5 et 1/20 de centimètre cube. De même, la paralysie devient nette après un délai de même durée pour des doses de toxine allant de 1/5 à 1/6 de centimètre cube. Par contre, elle ne s'affirme d'une manière nette que plus tardivement pour une dose de 1/20 de centimètre cube. D'autre part, avec les doses de 1/5 à 1/12,5 de centimètre cube, les cobayes succombent après un temps à peu près identique. Par contre, les doses de 1/16 et de 1/20 de centimètre cube permettent la survie des animaux. Quant aux quantités de toxine, inférieures à 1/20 de centimètre cube, elles ne produisent généralement que des paralysies peu marquées et d'évolution courte.

Il résulte de là que si des doses de toxine élevées provoquent des phénomènes paralytiques, elles occasionnent, d'autre part, la mort de l'animal après un délai trop court pour que leur emploi permette l'observation suffisante des accidents paralytiques. Les doses de 1/16 à 1/20 de toxine modifiée sont particulièrement propices à la production expérimentale de phénomènes paralytiques. Avec la dose de 1/20 de centimètre cube, nous avons observé des résultats comparables à ceux de Ramon et Debré. Les phénomènes sont nets après une période de treize jours, ce qui n'est pas très éloigné de l'incubation de quinze à vingt jours signalée par ces derniers auteurs. Notons, en outre, que les conséquences de l'injection de cette dose peuvent être rapprochées du syndrome clinique observé chez l'enfant. En effet, l'observation prolongée des cobayes ainsi traités nous a permis de constater non seulement leur survie, mais aussi le retour de la motricité normale du membre paralysé, après un délai de un mois à un mois et demi. Ce fait peut être comparé à la guérison qu'on observe fréquemment en clinique humaine, guérison lente mais spontanée des paralysies post-diphétériques.

DOSAGE DE L'ANTITOXINE DANS LE SÉRUM DES COBAYES  
AVANT OU APRÈS L'APPARITION DE LA PARALYSIE.

Römer a proposé une méthode permettant de déterminer, par l'emploi de très petites quantités de sérum, la teneur de celui-ci en antitoxine : utilisant la méthode des injections intradermiques au cobaye, il compare la réaction provoquée par des mélanges variés de toxine diphétique et du sérum expérimenté, à la réaction provoquée par l'injection de mélanges contenant les mêmes quantités de toxine et de sérum-étalon.

Nous avons adopté la technique de Römer, modifiée comme suit par Glenny et Allen [5].

A des cobayes de 290 à 300 grammes, on injecte, par voie intradermique, 0 c. c. 2 de mélanges variés de toxine et de sérum. La réaction se lit après quarante-huit heures. Si l'on a utilisé des mélanges de toxine et de sérum-étalon, on constate que l'injection de certains d'entre eux provoque une réaction se manifestant par une plaque d'un rouge foncé de la grandeur

d'une pièce d'un franc, reposant sur un fond œdématié. La lésion évolue parfois vers la nécrose et aboutit à la formation d'une croûte qui se désagrège et disparaît. Glenny et Allen appellent « Skin test dose » la quantité minima de toxine qui, mélangée à 1/500 d'unité antitoxique, donne encore cette réaction. Des quantités décroissantes d'un sérum étant mélangées à la « Skin test dose », la quantité maxima de sérum qui, additionnée à celle-ci, permet encore une réaction positive, est dite contenir 1/500 d'unité antitoxique.

Nous nous sommes servi d'une toxine diphtérique aimablement fournie par l'Institut Pasteur de Bruxelles, toxine dont la dose minima mortelle était de 0 c. c. 00045. Nous avons déterminé la « Skin test dose » de cette toxine, au sens de Glenny et Allen, en utilisant un sérum antidiphtérique, titrant 450 unités par centimètre cube, et fourni par le même Institut. La « Skin test dose » a été trouvée égale à 0 c. c. 0006. C'est cette dose qui a été employée dans tous les essais décrits ci après, ayant pour objet de déterminer la teneur en antitoxine du sérum d'animaux atteints de paralysie diphtérique expérimentale. Celle-ci a été provoquée, suivant les diverses séries d'animaux, par des doses différentes de toxine modifiée : les séries I et IV ont reçu 1/10 de centimètre cube de toxine ; la série II, 1/15 de centimètre cube ; la série III, 1/20 de centimètre cube ; la série V, 1/30 de centimètre cube. Dans chacune de ces séries, chaque fois que faire se pouvait, nous avons divisé les animaux en deux groupes : l'un ne reçut aucun traitement ; le second fut traité par des doses différentes d'une solution d'hexaméthylène-tétramine en liquide glucosé. Disons tout de suite que ces injections médicamenteuses n'ont donné aucun résultat. Les cobayes ont été saignés à différents moments de leur paralysie. La recherche de l'antitoxine dans tous les sérums ainsi obtenus a été faite de la même manière : à 0,0006 de toxine diluée de façon à être contenue dans 0 c. c. 1 de liquide, on ajoute des quantités décroissantes de sérum, elles-mêmes renfermées dans 0 c. c. 1 de liquide. Le volume total (0 c. c. 2) est injecté par voie intradermique et la lecture de la réaction faite quarante-huit heures après. La quantité maxima de sérum permettant l'apparition de la diphtérino-réaction, contenant, conformément aux données de Glenny et Allen, 1/500 d'unité

antitoxique, on peut aisément en déduire la teneur en antitoxine du sérum expérimenté.

Ce tableau confirme nettement les résultats de Ramon, Debré et Uhry. Ces auteurs ont constaté, en effet, qu'au moment où apparaissent chez le cobaye injecté de toxine modifiée, les premiers symptômes de paralysie, on peut déceler dans son sérum la présence de l'antitoxine et que celle-ci atteint, souvent plus de 1/10 d'unité antitoxique. Nous avons pu, de même, mettre en évidence l'antitoxine chez un certain nombre de nos animaux. Plusieurs de nos essais montrent même que l'antitoxine peut être décelée avant que n'apparaissent les phénomènes de paralysie (cobayes 1, 2, 9 chez lesquels l'antitoxine est décelée respectivement aux douzième, quatorzième et douzième jours aux doses de 1/10, 1/25 et 1/3 d'unité antitoxique, alors que la paralysie n'apparaît que le seizième, le seizième et le dix-huitième jour). Il ne semble donc pas douteux que, comme le pensent Ramon, Debré et Uhry, la fixation sur le système nerveux d'une partie de la toxine injectée se produise très rapidement et soit antérieure à l'apparition d'antitoxine dans le sérum. D'autre part, la production de celle-ci n'arrête nullement l'évolution de la paralysie. Il va de soi, comme l'indique le tableau précédent, qu'on peut déceler l'antitoxine dans le sérum de l'animal injecté pendant qu'évoluent les phénomènes de paralysie. Nous avons, en effet, mis l'antitoxine en évidence chez un grand nombre de cobayes, soit peu de temps après l'éclosion de la paralysie (cobayes 8, 10, 18), soit un certain temps après (deuxième saignée des cobayes 3, 13, 15 et 17). L'antitoxine disparaît cependant, après un certain temps, alors que persistent évidemment les phénomènes de paralysie (cobayes 5, 12, 16). Nous devons encore ajouter que nous n'avons pu, chez certains animaux, déceler de production d'antitoxine (cobayes 3, 4, 14, 15, 19, 21).

En conclusion, l'injection intramusculaire au cobaye de toxine modifiée suivant la technique de Ramon, Debré et Uhry provoque, ainsi que ces auteurs l'ont constaté, l'apparition de phénomènes de paralysie dont le délai de production, l'intensité et l'évolution sont influencés par la quantité de toxine utilisée.

La paralysie survient alors que l'animal a déjà pu produire de l'antitoxine diphtérique, décelable dans son sang. Il semble

SÉRUMS	COBAYES	DURÉE de l'incubation en jours	DATE de la saignée après l'injection	DILUTION O de sérum correspondant à 1/50 d'unité antitoxique par cent. cube	DILUTION A de sérum correspondant à
1 <sup>re</sup> série (1). Injection de 1/10 de cent. cube de toxine modifiée.	4 2 3 4 5	16 16 10 10 16	12 <sup>e</sup> jour. 14 <sup>e</sup> jour. 2 <sup>5</sup> <sup>e</sup> jour. 3 <sup>e</sup> jour. 58 <sup>e</sup> jour.	OEdème léger — + faible. +	OEdème — + faible. ++ faible.
2 <sup>e</sup> série. Injection de 1/15 de cent. cube de toxine modifiée.	6 7 8 9 10 11 12	4 18 18 18 18	4 <sup>e</sup> jour. 22 <sup>e</sup> jour. 33 <sup>e</sup> jour. 12 <sup>e</sup> jour. 22 <sup>e</sup> jour. 50 <sup>e</sup> jour.	+ faible.	++ faible.
3 <sup>e</sup> série. Injection de 1/20 de cent. cube de toxine modifiée.	13 13 14 14 15 15 16	6 6 6 6 6 6	4 <sup>e</sup> jour. 22 <sup>e</sup> jour. 12 <sup>e</sup> jour. 33 <sup>e</sup> jour. 22 <sup>e</sup> jour. 45 <sup>e</sup> jour. 50 <sup>e</sup> jour.	+ + faible. +	+ faible.
4 <sup>e</sup> série. Injection de 1/10 de cent. cube de toxine modifiée.	17 17 18 18 19 20	6 6 6 6 6	4 <sup>e</sup> jour. 22 <sup>e</sup> jour. 12 <sup>e</sup> jour. 22 <sup>e</sup> jour. 45 <sup>e</sup> jour.	— + faible. ++	+ faible.
5 <sup>e</sup> série. Injection de 1/30 de cent. cube de toxine modifiée.	21 21 22 22	11 11	8 <sup>e</sup> jour. 22 <sup>e</sup> jour. 11 <sup>e</sup> jour. 33 <sup>e</sup> jour.	+ très faible. +	

(1) La longueur du délai écoulé, dans cette série, avant l'apparition de symptômes paralytiques fournie par M. Ramon, mais employée après un séjour prolongé à basse température.

qu'on doive déduire de là, comme l'ont fait divers savants et notamment les auteurs précités, que la fixation sur le système nerveux de la toxine injectée s'effectue très précolement à un moment où les humeurs ne contiennent pas encore l'antitoxine susceptible de la neutraliser. L'antitoxine produite après cette fixation sur le système nerveux n'influence pas l'apparition de

			DILUTION C de sérum correspondant à 1/3 d'unité antitoxique par cent. cube	DILUTION D de sérum correspondant à 1 unité d'antitoxine par cent. cube	DILUTION E de sérum correspondant à 2 unités antitoxiques par cent. cube	OBSERVATIONS
	+++					Cobaye 3. Traité à l'urénile : 3 cent. cubes. Cobaye 5. Traité à l'urénile : 3 cent. cubes.
+ faible.	+ faible.	+ faible.	OEdème mort.	++		Cobaye 7. Mort le 12 <sup>e</sup> jour.  Cobaye 9. Traité à l'urénile : 1 cent. cube. Cobaye 10. Traité à l'urénile : 4 cent. cube. Cobaye 11. Mort le 28 <sup>e</sup> jour. Cobaye 12. Traité à l'urénile : 3 cent. cubes.
						Cobaye 15. Traité à l'urénile : 4 cent. cube. Cobaye 16. Traité à l'urénile : 3 cent. cubes.
+ faible.	+ faible.					Cobaye 18. Mort le 34 <sup>e</sup> jour. Cobaye 19. Traité à l'urénile : 4 cent. cube. Cobaye 20. Traité à l'urénile : 4 cent. cube.

ison à celle de la série 4, nous paraît due à l'utilisation, dans la série 1, d'une toxine modifiée

la paralysie. Ces faits s'accordent avec les constatations des auteurs qui, chez des sujets frappés de paralysie apparemment consécutive à des atteintes méconnues de diphtérie, ont pu mettre en évidence dans le sérum des quantités anormalement élevées d'antitoxine, rendant ainsi plus vraisemblable encore l'origine diphtérique de l'affection observée.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] RAMON, DEBRÉ, UHRY, Paralysie diptérique expérimentale et immunité anti-toxique active. *C. R. Soc. de Biol.*, **110**, 1932, p. 42.
- [2] GENGOU et COHEN, Essai de séro-diagnostic des paralysies post-diphétiques, *Revue française de Pédiatrie*, **9**, n° 5, 1933.
- [3] Pierre UHRY, Les paralysies diphétiques. Etude expérimentale et anatomo-pathologique. *Thèse de Paris*, 1933.
- [4] RAMON, DEBRÉ, UHRY, La paralysie diptérique expérimentale. Ces *Annales* **52**, janvier 1934.
- [5] A. T. GLENNY et K. ALLEN, The testing of diphtheria-toxin and antitoxin by intraeutaneous injection into guinea-pigs. Preliminary note. *The Journ. of Pathol. and Bacteriol.*, vol. XXIV, 1921.

# **ETUDES SUR LA DISSOCIATION DU *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

par KONRAD E. BIRKHAUG

(*Institut Pasteur.  
Laboratoires de Recherches sur la Tuberculose.*)

## **DEUXIÈME PARTIE**

**I. — Propriétés morphologiques,  
culturales et physiques des variétés Ch,  
R et S de colonies de bacilles tuberculeux humains  
et de bacilles atténusés.**

### **III. — *Souches humaines.***

Les souches de stock d'Humaine Anna et d'Humaine Ratti ne montrent que des colonies R sur les milieux solides ou liquides. La dissociation de ces souches a été essayée *in vivo* par l'injection d'environ 1 milligramme d'une culture sur milieu de Lœwenstein, âgée de quatre semaines, dans un ganglion lymphatique cervical. 6 cobayes, pesant de 235 à 287 grammes, ont été injectés avec Humaine Anna et 6 autres, pesant de 255 à 295 grammes, avec Humaine Ratti. Sur une série de 115 tubes de milieu de Lœwenstein,ensemencés avec le culot de sang obtenu par 22 ponctions cardiaques sur les animaux inoculés avec Humaine Anna, 81, soit 73 p. 100, ont été trouvés positifs après huit semaines à 37°5. Le nombre des colonies a varié de 1 à 258 par tube. Un total approximatif de 2.100 colonies a été obtenu, parmi lesquelles nous avons isolé 105 colonies S typiques, soit 5 p. 100 et 6 colonies Ch, soit 0,3 p. 100. Les 94 p. 100 restants étaient des colonies R typiques. Sur une série de 165 tubes de milieu de Lœwenstein,ensemencés avec le culot de sang obtenu par 21 ponctions cardiaques sur des ani-

maux inoculés avec Humaine Ratti, 102 tubes, soit 61,8 p. 100, ont été trouvés positifs, après huit semaines à 37°5. Le nombre des colonies a varié de 1 à 45, dans un seul tube. Un total approximatif de 850 colonies a été obtenu, comprenant 62 colonies S typiques, soit 7,3 p. 100, sans aucune colonie Ch. Les 92,7 p. 100 restants étaient des colonies R typiques (tableau I). En raison de la similitude frappante des variétés Humaine Anna et Humaine Ratti, nous nous bornerons à décrire les variétés S, R et Ch d'Humaine Anna.

*Variété S d'Humaine Anna.* (*Planche X, fig. 1 à 5 ; planche XII, fig. 11 et 12.*) — Les colonies S hémisphériques, blanc ivoire, humides, luisantes, de contours réguliers, mesurent de 1 à 4 millimètres de diamètre. (Pl. X, fig. 1). Ce type a été rencontré plus fréquemment que les colonies plus grandes, plates, irrégulièrement étendues, à centre bosselé, d'aspect plutôt mat, qui mesuraient parfois 15 millimètres de diamètre après huit semaines à 37°5 sur milieu de Lœwenstein. Malgré une ressemblance sous beaucoup de rapports avec la variété S de la Bovine Vallée, l'Humaine Anna S croît, d'une façon très atypique sur la pomme de terre glycérinée. Fréquemment, l'humidité initiale disparaît après une semaine d'incubation et le développement en surface prend tous les caractères essentiels de la variété R. (Pl. X, fig. 2). Par réensemencement sur milieu de Lœwenstein, nous avons obtenu parfois un mélange de colonies R et S et à 4 occasions des colonies R seulement. Sur le milieu de Lœwenstein, la culture S initiale est restée pure pendant vingt-huit repiquages bimensuels. La croissance est excessivement lente sur pomme de terre glycérinée et biliée aussi bien que sur gélose-bouillon, sans glycérine. A la température du laboratoire, croissance lente, tant sur pomme de terre glycérinée qu'en milieu de Sauton et sur milieu de Lœwenstein. Une seule colonie S ensemencée au centre d'un tube de milieu de Lœwenstein a continué de se développer à la température du laboratoire pendant treize mois, jusqu'à atteindre 15×21 millimètres de diamètre. La colonie est restée crémeuse, d'un blanc d'ivoire, humide, luisante et légèrement ondulée. (Pl. X, fig. 5). Aucune pigmentation ne s'est produite. La variété S d'Humaine Anna pousse lentement et d'une manière diffuse dans la profondeur du bouillon non glycériné, sans former de voile. Dans

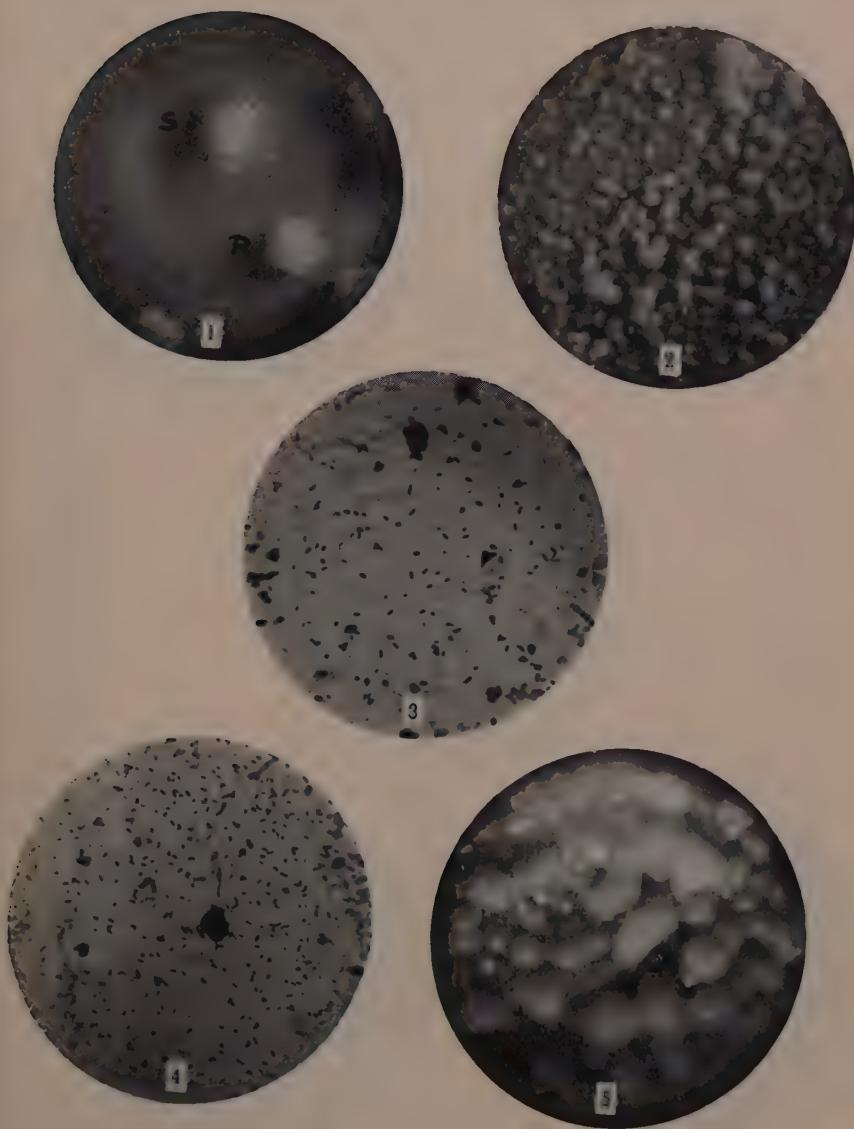


PLANCHE X.

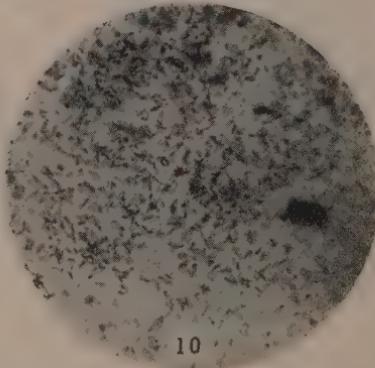
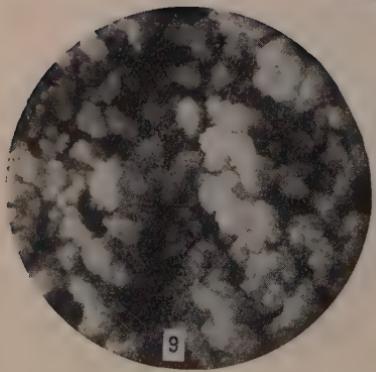
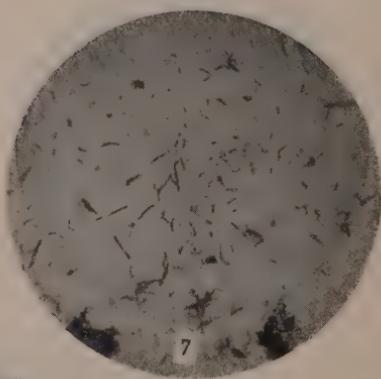
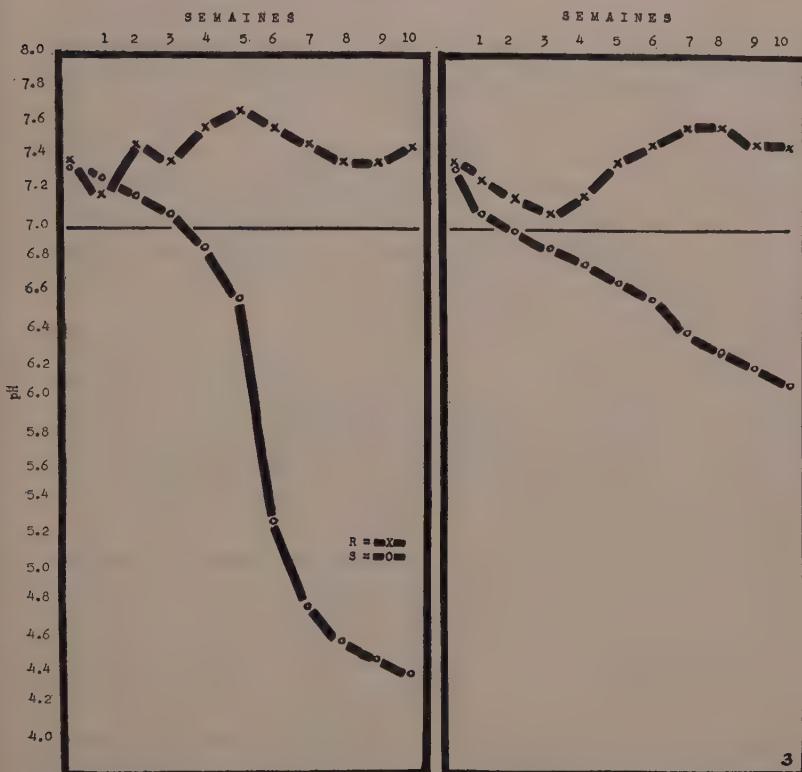


PLANCHE XI.

le milieu de Sauton et en bouillon glycériné ( $pH = 7,4$ ), elle a poussé faiblement et d'une manière diffuse pendant les onze premiers repiquages bimensuels; aucun voile n'a apparu. Au douzième repiquage, un voile délicat et humide s'est formé en



Humaine Anna R<sub>40</sub> et S<sub>40</sub> sur le milieu de Sauton. Lecture hebdomadaire du pH.

Humaine Ratti R<sub>8</sub> et S<sub>8</sub> sur le milieu de Sauton. Lecture hebdomadaire du pH.

GRAPHIQUE 3.

îlots. L'évolution diphasique s'est produite au quatorzième passage et a continué jusqu'au trentième. La courbe du pH, après dix semaines à 37°5, reste acide (graph. 3). Le voile est plat, humide, luisant, il tend à grimper le long des parois du flacon jusqu'à environ 5 millimètres au-dessus du liquide. (Pl. XII, fig. 11 et 12). La partie de voile qui adhère aux parois est

excessivement mince et diaphane, en contraste avec le voile épais, ridé et irrégulier de la variété R. Aucune pigmentation n'est transmise au milieu de Sauton. Une douceâtre odeur de fruit se révèle dans la culture au cours de la quatrième semaine.

Les limites de pH pour la croissance de la variété S d'Humaine Anna, vont de 4,0 à 8,5 dans le milieu de Sauton tamponné (100 à 150 cent. cubes de volume). Malgré une croissance diffuse à travers le liquide et un développement en amas au fond et le long des parois du ballon, il ne se forme aucun voile au-dessous de pH 5,5 et au-dessus de 8,0. Un voile S typique se produit entre pH 6,0 et 7,5. La croissance optimum s'opère entre pH 6,0 et 6,5. Pour ces concentrations, les poids des bacilles séchés sont respectivement de 1 gr. 057 et 1 gr. 329 pour 150 cent. cubes de milieu de Sauton, après dix semaines à 37°5. (Tableau V). En anaérobiose stricte, toute croissance cesse.

TABLEAU VI. — Concentration de diverses substances permettant d'entraver la croissance des souches aviaire, bovine et humaine et leurs variétés dissociées R et S de bacilles tuberculeux.

(Les chiffres indiquent les maxima de dilution des substances en milieu de Sauton qui entravent complètement la croissance des bacilles après incubation de huit semaines à 37°5.)

TYPES et leur variétés R et S dissociées	VIOLET de Geniane	VERT MALACHITE	BICHLORURE de mercure	PHÉNOL-MERCURE- NITRIQUE	SANOCHRYSINE	ACIDE PHÉNIQUE
Av. Ninni . . .	1 : 36,000	1 : 4,000	1 : 3,200	1 : 3,600,000	1 : 1,600	1 : 1,800
Av. Ninni R <sub>7</sub> . .	1 : 20,000	1 : 500	1 : 3,200	1 : 3,200,000	2 : 4,000	1 : 1,600
Av. Ninni S <sub>7</sub> . .	1 : 36,000	1 : 4,000	1 : 3,000	1 : 3,600,000	1 : 1,600	1 : 1,800
Puntoni . . .	1 : 32,000	1 : 1,600	1 : 3,600	1 : 3,200,000	1 : 1,000	1 : 1,600
Puntoni R <sub>9</sub> . .	1 : 24,000	1 : 1,200	1 : 3,200	1 : 3,200,000	1 : 800	1 : 1,200
Puntoni S <sub>9</sub> . .	1 : 32,000	1 : 1,600	1 : 3,600	1 : 3,200,000	1 : 1,000	1 : 1,600
BCG (447-51) . .	1 : 20,000	1 : 1,000	1 : 3,200	1 : 3,000,000	1 : 1,000	1 : 1,600
BCG R <sub>17</sub> . . .	1 : 20,000	1 : 1,000	1 : 3,200	1 : 3,000,000	1 : 1,000	1 : 1,600
BCG S <sub>17</sub> . . .	1 : 30,000	1 : 2,000	1 : 3,600	1 : 3,200,000	1 : 1,000	1 : 1,600
Bov. Vallée . . .	1 : 24,000	1 : 500	1 : 4,000	1 : 3,000,000	1 : 1,000	1 : 1,600
Bov. Vallée R <sub>40</sub> .	1 : 24,000	1 : 500	1 : 4,000	1 : 3,000,000	1 : 1,000	1 : 1,600
Bov. Vallée S <sub>40</sub> .	1 : 32,000	1 : 2,000	1 : 4,000	1 : 3,200,000	1 : 1,000	1 : 1,600
Hum. Anna . . .	1 : 20,000	1 : 500	1 : 3,600	1 : 3,000,000	1 : 1,000	1 : 1,600
Hum. Anna R <sub>40</sub> .	1 : 20,000	1 : 500	1 : 3,600	1 : 3,000,000	1 : 1,000	1 : 1,600
Hum. Anna S <sub>40</sub> .	1 : 30,000	1 : 2,000	1 : 3,600	1 : 3,000,000	1 : 1,000	1 : 1,600
Hum. Ratti . . .	1 : 20,000	1 : 500	1 : 3,600	1 : 3,200,000	1 : 800	1 : 1,200
Hum. Ratti R <sub>6</sub> .	1 : 20,000	1 : 500	1 : 3,600	1 : 3,200,000	1 : 800	1 : 1,200
Hum. Ratti S <sub>6</sub> .	1 : 30,000	1 : 2,000	1 : 3,600	1 : 3,200,000	1 : 1,000	1 : 1,600

Aucune différence appréciable n'a été trouvée entre les variétés S des souches humaines et celles décrites pour les aviaires et bovines, quant à l'assimilation des glucides, la résistance aux colorants et aux désinfectants (tableau VI) et l'action bactéricide de la chaleur (tableau VII). La mobilité électrophorétique enregistrée a été 0,45, 0,6, 0,5 et 0,5  $\mu$  par seconde et par volt-centimètre, pour les cultures d'Humaine Anna variété S, âgées d'une, deux, trois et quatre semaines respectivement. (Tableau VIII). L'agglutination acide a donné pratiquement les mêmes résultats que ceux obtenus avec la variété S de Bovine Vallée (tableau IX).

Comme d'autres variétés S décrites plus haut, la variété S d'Humaine Anna s'émulsionne facilement. Elle se compose de bâtonnets acido-résistants, Gram-positifs, courts, épais, droits ou légèrement incurvés, parmi lesquels on trouve quelques bacilles massués, mais jamais de formes ramifiées. (Pl. IX, fig. 3-4). Les bacilles isolés mesurent de 0,3  $\mu$  à 5,4  $\mu$  de long et 0,2  $\mu$  à 0,7  $\mu$  de large. Les dimensions moyennes de 1.000 bacilles sont 2,0  $\mu$  de longueur et 0,5  $\mu$  de largeur. (Tableau II). Presque 20 p. 100 des bacilles sont décolorés en dix minutes par une solution d'acide sulfurique à 20 p. 100.

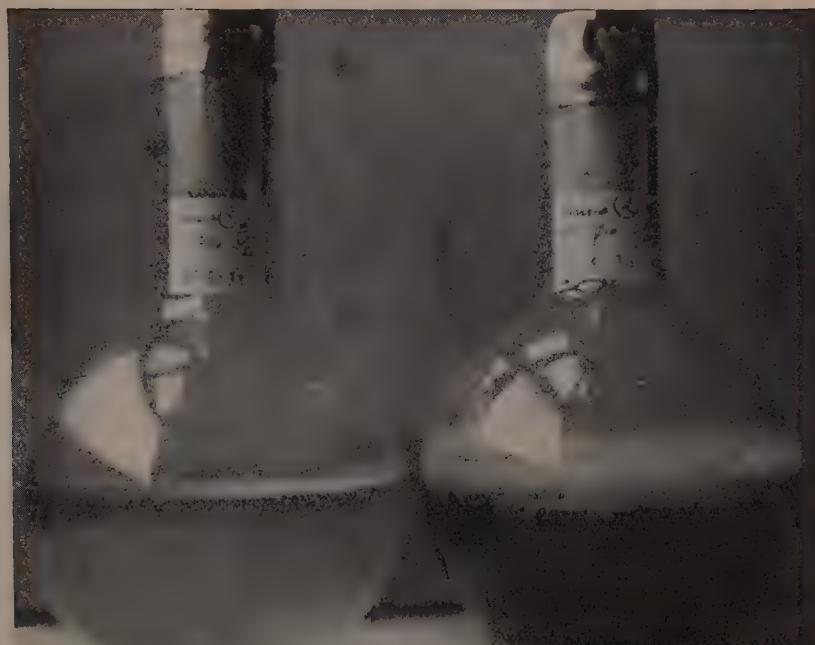
Nous avons déjà mentionné le fait qu'*in vitro* la variété S d'Humaine Anna avait gardé ses caractères morphologiques sur le milieu de Löwenstein pendant vingt-huit passages bimensuels. Sur pomme de terre glycérinée, l'instabilité a été prononcée, allant même jusqu'à la conversion complète de S en R dans 5 subcultures sur 28. Sur des cultures à partir d'un seul bacille, nous avons également remarqué l'instabilité de cette variété sur pomme de terre glycérinée. Dans le milieu de Sauton, cette instabilité a été presque aussi marquée. Dans ce milieu, la dissociation spontanée a été toujours accompagnée d'un changement de la courbe du pH vers l'alcalinité ou la neutralité, avec retour de la virulence initiale pour le cobaye. En laissant des cultures sur milieux liquides ou solides à la température du laboratoire et à la lumière, nous avons observé d'aussi fréquentes dissociations de S en R et Ch que par l'addition à ces milieux de sérum de lapin anti-S, de bacilles S morts, de filtrats de cultures S, ou d'organes provenant d'animaux immunisés par la variété S tuée par la chaleur. *In vivo* nous

avons observé que la variété S, en certains cas, garde ses caractères jusqu'à trois cent quatre-vingt-neuf jours après l'inoculation de l'animal. A plusieurs autres occasions, nous avons obtenu de nombreuses colonies R et Ch avec des cultures de tissus provenant d'animaux inoculés avec la variété S pure. Il appert donc que la variété S du bacille humain possède le même pouvoir de dissociation que les variétés S aviaires et bovines (tableau II).

TABLEAU VII. — Action de la chaleur sur la vitalité des variétés R et S du bacille tuberculeux des types aviaire, bovin et humain émulsionnés dans l'eau physiologique.

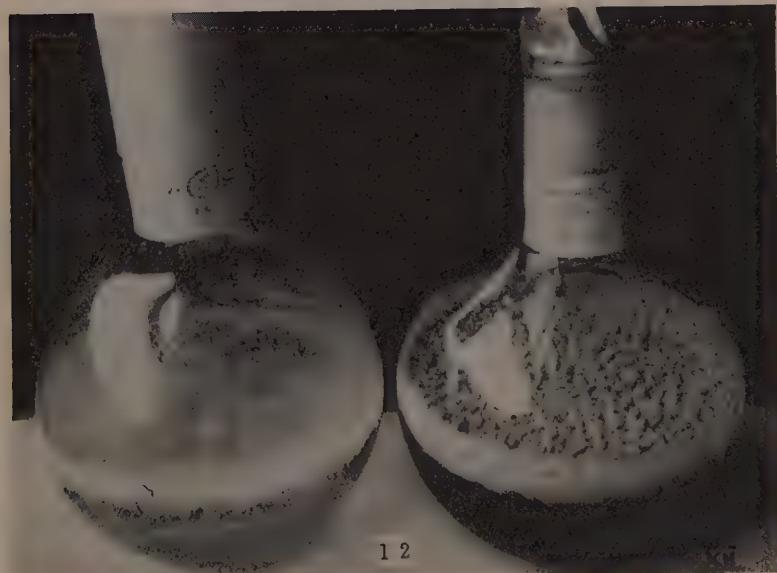
TYPES ET VARIÉTÉS	TEMPÉRATURE								
	43°	47°5	50°0	52°5	55°0	57°5	60°0	62°5	65°0
<i>Quinze minutes .</i>									
Av. Ninni R <sub>12</sub> . . .	+++	+++	++	+	±	0	0	0	0
Av. Ninni S <sub>12</sub> . . .	+++	+++	+++	+++	+++	++	+		±
Av. « B » R <sub>9</sub> . . .	+++	+++	+++	++	+	±	0	0	0
Av. « B » S <sub>9</sub> . . .	+++	+++	+++	+++	+++	++	+		0
Puntoni R <sub>11</sub> . . .	+++	+++	+++	+++	++	0	0	0	0
Puntoni S <sub>11</sub> . . .	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	0
Bov. Vallée R <sub>10</sub> . . .	+++	+++	++	++	+	±	0	0	0
Bov. Vallée S <sub>10</sub> . . .	+++	+++	+++	+++	+++	++	+		±
Bov. BCG R <sub>18</sub> . . .	+++	+++	+++	+++	++	+	0	0	0
Bov. BCG S <sub>18</sub> . . .	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	±
Bov. « S-16 » R <sub>8</sub> . . .	++*	+++	+++	+++	++	+	±	0	0
Bov. « S-16 » S <sub>8</sub> . . .	++*	+++	+++	+++	+++	++	++	+	±
Hum. Anna R <sub>11</sub> . . .	+++	+++	+++	+++	+++	+	0	0	0
Hum. Anna S <sub>11</sub> . . .	+*	+++	+++	+++	+++	++	++	+	±
Hum. Ratti R <sub>8</sub> . . .	+++	+++	+++	+++	+++	++	0	0	0
Hum. Ratti S <sub>8</sub> . . .	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	±
Hum. Bécret R <sub>8</sub> . . .	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	±	0
Hum. Bécret S <sub>8</sub> . . .	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	0
<i>Trente minutes :</i>									
Av. Ninni R <sub>12</sub> . . .	+++	+++	++	0	0	0	0	0	0
Av. Ninni S <sub>12</sub> . . .	+++	+++	+++	++	±	0	0	0	0
Bov. BCG R <sub>18</sub> . . .	+++	+++	++	+	0	0	0	0	0
Bov. BCG S <sub>18</sub> . . .	+++	+++	+++	+++	++	+	0	0	0
Hum. Ratti R <sub>8</sub> . . .	+++	+++	+++	+	0	0	0	0	0
Hum. Ratti S <sub>8</sub> . . .	+++	+++	+++	+++	++	+	0	0	0

Variété R d'Humaine Anna. (Planche XI, fig. 6 à 10; planche XII, fig. 11 et 12.) — Les colonies R d'Humaine Anna ne diffèrent par aucun caractère de celles des variétés R aviaires et bovines. La croissance est plus rapide que celle de la



11

12



11

12

PLANCHE XII.

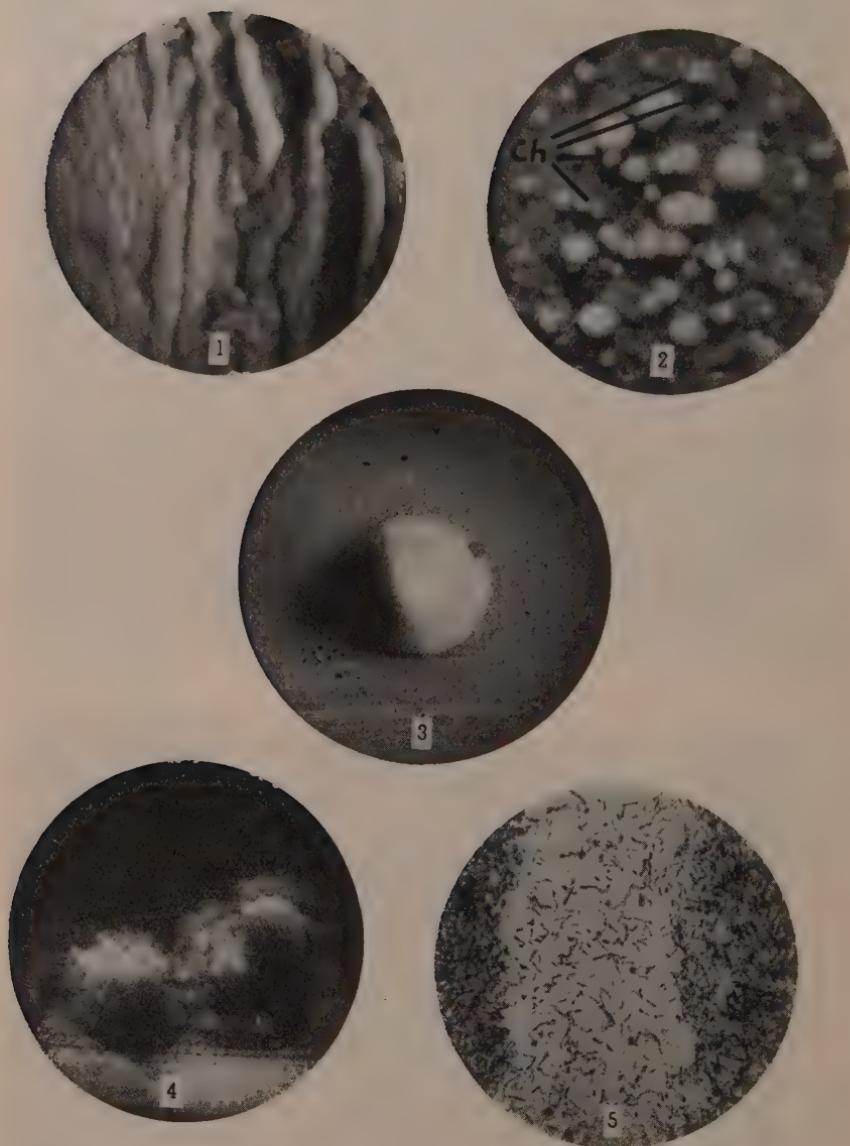


PLANCHE XIII.

variété S. Dans le milieu de Sauton et bouillon glycériné, la courbe de pH oscille entre 7,2 et 7,7 pendant dix semaines à 37°5. (Graphique 3). Aucune croissance en milieu de Sauton tamponné à pH = 4,0 à 5,5 ou 8,5. Les limites optima de croissance sont comprises entre 7,0 et 8,0 et les poids de bacilles séchés sont de 1.845, 1.935 grammes respectivement, pour 150 cent. cubes de milieu de Sauton, après dix semaines à 37°5. (Tableau V.) En contraste avec ces résultats, la variété S a donné 1.106, 0,646 grammes respectivement dans les mêmes limites du pH. En anaérobiose stricte, absence de croissance.

Il n'existe aucune différence essentielle entre les variétés R humaines et bovines quant à la décomposition des glucides, la résistance aux colorants et aux désinfectants et l'action bactéricide de la chaleur. (Tableaux VI et VII.) La différence de mobilité électrophorétique entre les variétés R et S humaines est la plus marquée pendant la troisième semaine de culture; à ce moment la mobilité de la variété R est double de celle de la variété S. (Tableau VIII.) L'agglutination par les acides est la même que celle obtenue avec la variété R bovine ( $\mu$ H = 4,8), mais elle diffère sensiblement de celle obtenue avec la variété S [ $\mu$ H = 2,8]. (Tableau II.)

TABLEAU VIII. — Mobilité des variétés R et S des bacilles tuberculeux dissociés, des types aviaire, bovin et humain.

TYPES ET VARIÉTÉS	AGE DE LA CULTURE EN SEMAINES			
	1	2	3	4
	MICRA PAR SECONDE ET PAR VOLT-CENTIMÈTRE			
Av. Ninni R. . . . .	0,8	0,8	1,0	0,8
Av. Ninni S. . . . .	0,5	0,5	0,4	0,5
Bov. Vallée R. . . . .	0,8	0,8	1,0	0,55
Bov. Vallée S. . . . .	0,4	0,4	0,4	0,4
Bov. BCG R. . . . .	0,45	0,6	1,1	0,7
Bov. BCG S. . . . .	0,5	0,5	0,3	0,5
Hum. Anna R. . . . .	0,5	0,7	1,1	0,6
Hum. Anna S. . . . .	0,45	0,6	0,5	0,5
Hum. Ratti R. . . . .	0,6	0,8	1,1	0,8
Hum. Ratti S. . . . .	0,5	0,4	0,4	0,4

Les bacilles sont difficilement émulsionnables, fortement acido-résistants et Gram positifs, plus longs et plus minces que

ceux de la variété S (pl. XI, fig. 8), mesurant de 0,8  $\mu$  à 8,5  $\mu$  de long et 0,2  $\mu$  à 0,5  $\mu$  de large. Les dimensions moyennes de 1.000 bacilles sont 3,2  $\mu$  de longueur et 0,3  $\mu$  de largeur. (Tableau II). La plupart résistent à plus de dix minutes à la décoloration par l'acide sulfurique à 20 p. 100.

La petitesse relative des bacilles S par rapport aux bacilles R n'est qu'apparente, car les deux variétés présentent des formes très diverses.

*In vitro* la variété R a conservé ses caractères pendant vingt-huit réensemements bimensuels sur les milieux de Löwenstein, pomme de terre glycérinée et Sauton. Plusieurs colonies S et Ch typiques ont cependant été isolées de voiles de cultures R en milieu de Sauton laissées pendant trois à onze mois au laboratoire et à la lumière, après une incubation préalable de trois à quatre semaines à 37°5. D'autres colonies S et Ch ont été isolées de vieilles cultures sur pomme de terre glycérinée, laissées au laboratoire ou dans des milieux liquides, auxquels on avait ajouté 10 p. 100 de sérum de lapin anti-R et des morceaux stériles de reins, de foie et de rate provenant de cobayes et lapins immunisés avec des bacilles R tués par la chaleur. Mais de nombreuses colonies S ont été isolées également de ballons contenant 10 p. 100 de sérum de lapin normal, voire dans le milieu de Sauton non additionné de sérum. La particularité la plus frappante, après la dissociation d'une culture R en variétés S et Ch, consiste en ce que les deux variétés S et Ch donnent, en milieu de Sauton, une courbe de pH acide et qu'elles ont une virulence atténuée pour les animaux de laboratoire. *In vivo* nous avons, à maintes reprises, réussi à isoler des colonies S et Ch de cultures de tissus provenant d'animaux morts de tuberculose généralisée, provoquée par la variété R. La réinoculation des variétés S, obtenues par dissociation spontanée de variétés R, a encore produit un petit nombre de colonies R. Toutefois, nous n'avons pas réussi à obtenir des colonies R et S de la variété Ch injectée. Ainsi le cycle s'est complété une fois de plus, comme nous l'avons déjà montré pour les souches aviaires et bovines, ce qui confirme la convertibilité de R en S et de S en R.

*Variété Ch d'Humaine Anna.* (*Planche X, fig. 5.*) — Les colonies Ch d'Humaine Anna sont ocre jaune ou jaune orange,

de forme hémisphérique ou plate; elles s'étendent irrégulièrement et ressemblent de très près aux colonies Ch de la Bovine Vallée. Les bacilles sont acido-résistants, droits ou légèrement incurvés; la plupart prennent la coloration de façon uniforme. Les formes granuleuses offrent parfois l'aspect massué. Les bacilles mesurent de  $0,3\text{ }\mu$  à  $5,0\text{ }\mu$  de long et  $0,2\text{ }\mu$ ,  $0,5\text{ }\mu$  de large. (Tableau II.) Les dimensions moyennes de 1.000 bacilles sont  $2,2\text{ }\mu$  de longueur et  $0,3\text{ }\mu$  de largeur. Presque 10 p. 100 des bacilles sont décolorés complètement en dix minutes par l'acide sulfurique à 20 p. 100. De nombreux bâtonnets non acido-résistants se trouvent dans les jeunes cultures, tant sur milieux solides qu'en milieux liquides. Nous n'avons jamais observé de formes ramifiées typiques. *In vitro* aussi bien qu'*in vivo* nous n'avons pas réussi à altérer la stabilité de la variété Ch de souches humaines. De même, il nous a été impossible de différencier les bacilles des variétés Ch et S d'après la courbe du pH en milieu de Sauton, ni par l'assimilation des glucides, la résistance aux colorants et aux désinfectants, ni par l'action bactéricide de la chaleur, ni par l'électrophorèse ou l'agglutination acide.

**PROPRIÉTÉS PATHOGÈNES DES VARIÉTÉS S, R ET Ch DE SOUCHES HUMAINES.** — Les variétés R Anna et Ratti sont très virulentes pour les cobayes chez lesquels elles provoquent une tuberculose généralisée typique. Chez le lapin, la variété R Anna est relativement avirulente. Après le premier réensemencement, l'Humaine Ratti R dissociée est restée relativement avirulente pour le lapin, mais après vingt et un repiquages bimensuels sur pomme de terre glycérinée ( $pH=7,4$ ) nous avons observé, avec surprise, que 0 milligr. 01 (poids humide) en injection intraveineuse au lapin provoquait une tuberculose miliaire dans le poumon, mais non dans le foie, ni dans la rate et les reins. Une étude ultérieure de la culture de stock (constituée essentiellement de variété R) a révélé un accroissement similaire de virulence pour le lapin. Eliminant la possibilité d'une tuberculose spontanée, on peut admettre que la souche d'origine d'Humaine Ratti sur laquelle la variété R a été obtenue par dissociation *in vivo*, renfermait un mélange de bacilles bovins et humains et que la colonie de la variété R, isolée pour

obtenir la première subculture, contenait déjà un mélange de bacilles bovins et humains. Le type humain aurait dominé pendant les vingt et un réensemements qui ont précédé ce changement de virulence pour le lapin et, à ce moment-là, le type bovin aurait prédominé. Il ne faut pas perdre de vue, à ce sujet l'étude de Möllers [52] (1928) sur 17 infections mixtes de tuberculose humaine, qui, de son côté, a donné une explication plausible de quelques-uns des résultats positifs, publiés par Eber [53] (1906-1913) et récemment discutés par A. Stanley Griffith [54] (1930).

La variété S d'Humaine Anna et Ratti se comporte exactement comme les variétés S de Bovine Vallée et Bovine S-16. Les phénomènes toxiques provoqués par la variété S Humaine sont légèrement moins prononcés que ceux provoqués par la même variété des souches bovines. De fortes doses en injection sous-cutanée au cobaye ne déterminent que des lésions locales qui guérissent après ulcération. L'animal meurt de tuberculose miliaire du type Villemin, ou plus fréquemment de septicémie tuberculeuse de type Yersin lors d'inoculations intraveineuses, intrapéritonéales ou intraganglionnaires de fortes doses (5 à 15 milligrammes), en particulier de premières ou secondes subcultures. Après le troisième ou quatrième passage, la virulence se trouve fortement diminuée.

La variété Ch de souche humaine est relativement avirulente et ses effets toxiques sont moins prononcés pour le cobaye et le lapin que ceux observés pour la variété S.

#### SOUCHES ATTÉNUÉES.

#### IV. — *Souche atténuee Puntoni aviaire.*

La souche d'origine Puntoni était virulente pour la poule et le lapin en 1919. Cette virulence a diminué graduellement jusqu'à disparaître apparemment en 1930. La culture de stock non dissociée sur pomme de terre glycérinée est essentiellement S, développée en couche humide, luisante, grasse et de consistance uniforme. En milieu de Sauton et bouillon glycériné ( $pH = 7,4$ ), l'évolution diphasique s'est produite et la courbe du  $pH$  s'est abaissée définitivement vers l'acidité au cours de

la troisième semaine à 37°5 ( $pH = 5,8$ ). Au cours de la dixième semaine, elle était tombée à  $pH = 5,0$  (tableau III). Ceci contrastait avec la courbe alcaline suivie de la variété S non dissociée et dominante d'Aviaire Ninni et d'Aviaire B. Cette importante différence nous inciterait à classer cette souche parmi les bacilles tuberculeux des mammifères.

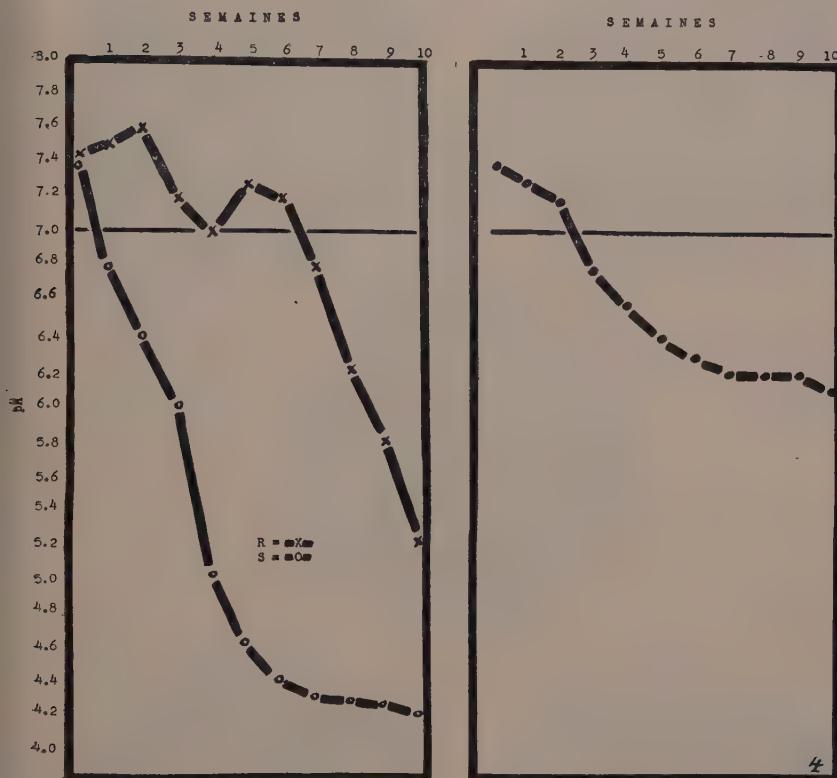
La dissociation *in vivo* a été essayée par l'inoculation d'environ 1 milligramme d'une culture sur pomme de terre glycérinée, âgée de quatre semaines, dans les ganglions lymphatiques cervicaux de 6 cobayes pesant de 226 à 310 grammes. Un total de 101 tubes de milieu de Lœwenstein ont été ensemencés avec le culot de sang de 16 ponctions cardiaques. Après huit semaines à 37°5, 63 tubes, soit 61,7 p. 100, étaient positifs et renfermaient de 1 à 58 colonies par tube. Il a été ainsi obtenu un total approximatif de 512 colonies distinctes parmi lesquelles 7 colonies R typiques, soit 1,4 p. 100; les 98,6 p. 100 restant représentaient des colonies S typiques. Pas une seule colonie Ch n'a été isolée (tableau I).

*Variété S Puntoni.* (*Pl. XIII, fig. 1 à 5; pl. XIV, fig. 7, et pl. XV, fig. 11.*) — Deux variétés dominantes de colonies S ont été observées : des colonies hémisphériques et des colonies plates à périphérie irrégulière, ressemblant à celles des types aviaires, bovins et humains. Sur pomme de terre glycérinée, la culture confluente de consistance grasse rappelait celle du type aviaire (*pl. XIII, fig. 1*). La croissance a été relativement lente sur les milieux solides et liquides. En bouillon sans glycérine, l'évolution diphasique ne s'est pas produite. En milieu de Sauton et bouillon glycériné ( $pH = 7,4$ ), elle a eu lieu (*pl. XV, fig. 11*) et la courbe du  $pH$  a montré une tendance nette vers l'acidité jusqu'à 5,4 après dix semaines à 37°5 (graphique 1). Au laboratoire, croissance lente mais diffuse sur les milieux solides et liquides, mais l'évolution diphasique ne se produit pas. La variété S est facilement émulsionnable avec trouble uniforme. Elle se compose de bacilles acido-résistants, Gram positifs, longs, minces, droits ou légèrement incurvés, la plupart fortement granuleux (*pl. XIII, fig. 5*). De nombreuses formes coccoïdes (granules) ont été trouvées dispersées sur les frottis de cultures jeunes ou vieilles de milieux solides ou liquides. Les bacilles mesurent de 0,5  $\mu$  à 6,5  $\mu$  de long et 0,2  $\mu$

à 0,6  $\mu$  de large. Les dimensions moyennes de 1.000 bacilles ont été 2,5  $\mu$  de longueur et 0,3  $\mu$  en largeur (tableau II). Parfois, des formes non acido-résistantes ont été observées dans les cultures jeunes, mais jamais de formes ramifiées typiques. Environ 15 p. 100 des bacilles ont été décolorés complètement en dix minutes par l'acide sulfurique à 20 p. 100.

La variété S de la souche Puntoni a montré une grande instabilité, tant *in vitro* qu'*in vivo*. Pendant deux passages bimensuels sur pomme de terre glycérinée, la variété S initiale est restée pure quant à sa forme et à ses réactions biologiques. Au dixième passage sur le même milieu ( $pH = 7,4$ ), la phase S fut complètement supprimée et fit place à une variété R typique. Transplantée en milieu ou en bouillon glycériné, cette variété n'a pas présenté d'évolution diphasique; le développement ne s'est fait qu'à la surface. La réaction de ces milieux a été nettement alcaline ( $pH = 7,8-7,6$ ) après dix semaines à 37°5. Quand cette variété R était diluée et ensemencée sur le milieu de Lœwenstein dans le but d'obtenir des colonies bien dispersées, on constatait l'apparition d'un petit nombre de colonies S typiques parmi les R dominantes. Pendant vingt et un passages ultérieurs et bimensuels (sur pomme de terre glycérinée, la souche d'origine S a fluctué fréquemment entre R et S. Chaque fois que dominait le type R, la courbe du  $pH$  en milieu de Sauton montrait une tendance vers la neutralité ou l'alcalinité et, chaque fois que dominait la variété S, cette courbe montrait une tendance vers la neutralité ou l'acidité. Nous avons observé une étroite relation entre la courbe du  $pH$  et la pureté ou l'impureté des variétés R et S. La stabilité de la variété S est plus grande sur le milieu de Lœwenstein, sans être absolue. Ainsi, une souche de variété S Puntoni a gardé son type pur pendant dix-huit passages bimensuels en milieu de Sauton ( $pH = 7,4$ ) et a montré régulièrement une courbe de  $pH$  acide après dix semaines dans ce même milieu. Au cours du dix-neuvième passage bimensuel sur le milieu de Lœwenstein, nous avons trouvé plusieurs colonies R typiques qui, à leur tour, ont donné en milieu de Sauton une évolution monophasique et une courbe de  $pH$  neutre et alcaline, comme d'ordinaire. La même culture est devenue R dominante au cours du vingt-quatrième passage sur milieu de Lœwenstein; le tube

ensemencé avec une dilution à 1/100.000 contenait 4,3 p. 100 de colonies S typiques, aucune colonie Ch et le restant des colonies R typiques. La réversibilité est montrée clairement par la transformation de colonies R en colonies S typiques, tant



Bovine Vallée S<sub>14</sub> et R<sub>41</sub> sur le milieu de Sauton auquel a été ajouté 10 p. 100 de sérum normal de lapin. Lecture hebdomadaire du pH.

Bovine Vallée S<sub>14</sub> et R<sub>41</sub>, mélangées à parties égales et ensemencées sur le milieu de Sauton. Lecture hebdomadaire du pH.

GRAPHIQUE 4.

sur milieu de Lœwenstein que sur pomme de terre glycérinée. *In vivo*, nous avons observé une instabilité plus fréquente de la variété S et une réversibilité plus fréquente des variétés R en S. En aucune occasion, nous n'avons réussi à isoler une colonie Ch d'une souche Puntoni.

*Variété R Puntoni.* (*Pl. XIV, fig. 6 à 10 ; pl. XV, fig. 11*). — Les colonies R plissées, enroulées, mates et presque sèches se conforment en général aux descriptions données précédemment pour les variétés R (*pl. XIV, fig. 6, 8 et 9*). L'aspect enroulé est en particulier plus prononcé sur pomme de terre glycérinée. Sur pomme de terre glycérinée et biliée, la culture donne une couche plate, mate et seulement légèrement ondulée. En milieu de Sauton et bouillon glycériné ( $pH = 7,4$ ), seule l'évolution monophasique se produit à la surface (*pl. XV, fig. 11*). Une pigmentation d'un jaune faible est transmise au milieu, après dix semaines à  $37^\circ\text{S}$  et ce dernier répand une odeur douceâtre de fleur. La courbe de  $pH$  montre une tendance nettement neutre ou alcaline avec un  $pH$  final de 7,8-8,0, après dix semaines à  $37^\circ\text{S}$  (graphique 1). La croissance est relativement rapide sur les milieux solides ou liquides. Sur bouillon ordinaire sans glycérine, elle est presque nulle. De même, à la température du laboratoire, la croissance est insignifiante. Les bacilles R ne s'émulsionnent pas facilement. Il se produit une agglutination spontanée dans l'eau physiologique et le liquide surnageant reste clair. L'examen au microscope montre des bâtonnets fortement acido-résistants et Gram positifs, longs, minces, granuleux, droits ou légèrement incurvés avec de rares granules disséminés (*pl. XIV, fig. 10*). Parfois, on rencontre des bacilles en forme de massue dans les cultures âgées. Dans les jeunes cultures, on observe de nombreux bacilles non acido-résistants. A aucun moment, nous n'avons trouvé de formes ramifiées typiques. Les bacilles de la variété R sont fortement acido-résistants, quelques-uns seulement sont décolorés complètement, en dix minutes, par l'acide sulfurique à 20 p. 100. Ils mesurent 0,7  $\mu$  à 8,2  $\mu$  de long et 0,3  $\mu$  à 5,6  $\mu$  de large. Les dimensions moyennes de 1.000 bacilles sont 3,1  $\mu$  de longueur et 0,3  $\mu$  de largeur (*tableau II*).

Il n'existe aucune différence essentielle entre les variétés R Puntoni et les variétés R des bacilles de mammifères quant à l'assimilation des glucides, la résistance aux colorants et aux désinfectants (*tableau VI*), l'action bactéricide de la chaleur (*tableau VII*) et l'agglutination acide (*tableau IX*).

Le type ne présente pas de stabilité absolue ni *in vitro*, ni *in vivo*. Au cours de neuf passages bimensuels sur pomme de terre

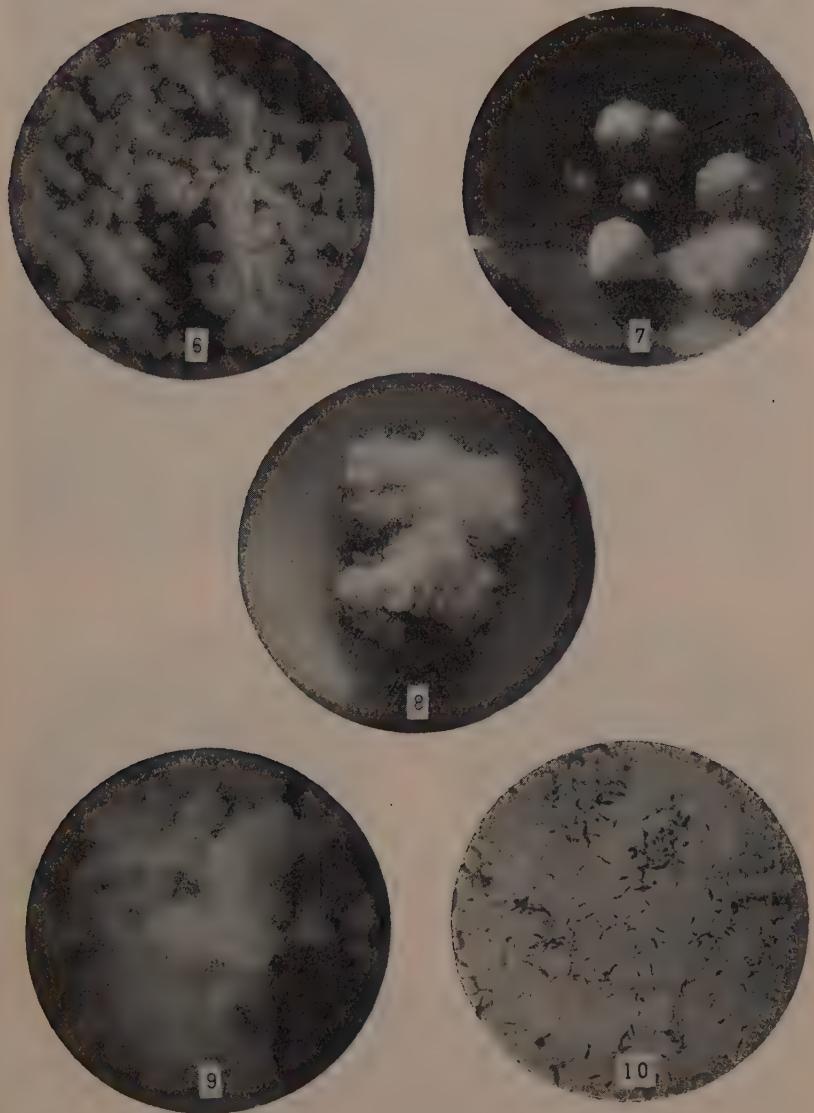


PLANCHE XIV.



PLANCHE XV

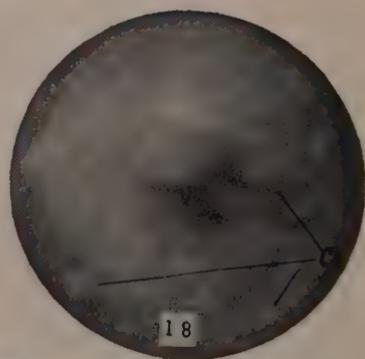


PLANCHE XIX.

glycérinée ( $pH = 7,4$ ) la variété R s'est développée en type R pur et des passages en milieu de Sauton ont reproduit la courbe de  $pH$  neutre ou alcaline, après dix semaines à  $37^{\circ}5$ . Dans les cultures de passage ultérieures, on a noté une oscillation similaire en variétés R et S et *vice versa*, comme pour la variété S Puntoni. Sur le milieu de Löwenstein, cette tendance à la dissociation est moins prononcée et dans les 16 cultures de passage bimensuelles la variété R d'origine s'est reproduite purement. Ensuite, les dissociations sont devenues fréquentes et ont été généralement accompagnées de réactions de la courbe de  $pH$  typiques pour la variété dominante. *In vivo* on observa la même instabilité, bien que les cultures des organes de 4 cobayes injectés avec la variété R aient donné des colonies du même type, cent soixante-seize, cent quatre-vingts, deux cent trente-six et deux cent quatre-vingt-cinq jours respectivement après l'inoculation intrapéritonéale. Ce résultat s'est peut-être accidentellement produit à un moment où les bacilles se trouvaient dans la phase R de dissociation, puisque la majorité des cultures de tissus ont révélé un mélange de R et S.

Un examen comparatif de frottis faits avec des variétés S et R Puntoni n'a révélé aucune différence morphologique permettant de distinguer ces deux variétés.

#### PROPRIÉTÉS PATHOGÈNES DES VARIÉTÉS S ET R PUNTONI.

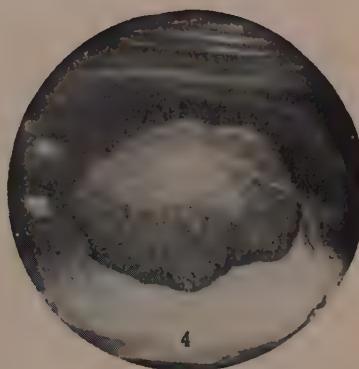
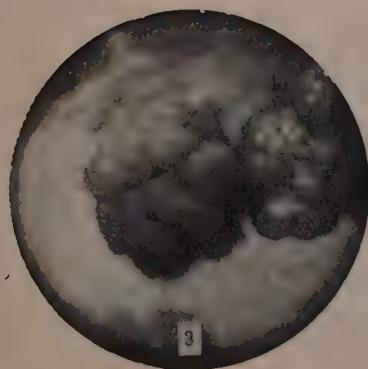
La variété S Puntoni est relativement peu virulente pour la poule, le cobaye et le lapin. Les effets toxiques sont directement proportionnels aux doses injectées. Les inoculations sous-cutanées provoquent des lésions nécrotiques aux points d'injection et dans les ganglions adjacents. Ces lésions se ramollissent et se cicatrisent ou se calcifient. Les injections intrapéritonéales au cobaye et intraveineuses au lapin provoquent la tuberculose du type Yersin avec hypertrophie du foie, de la rate et des ganglions lymphatiques. Tous les organes ainsi que la moelle osseuse fourmillent de bacilles. La formation d'abcès est fréquente, mais la tuberculose généralisée du type Villemin extrêmement rare. Les animaux qui ne succombent pas à la suite des effets toxiques du début, survivent et guérissent complètement, sans présenter jamais aucune lésion

tuberculeuse macroscopique, ni microscopique. La variété R est complètement avirulente pour la poule. L'injection sous-cutanée à des lapins et des cobayes de 10 milligrammes d'une culture sur pomme de terre glycérinée, âgée de quatre semaines, ne produit que des lésions localisées au point d'inoculation et aux ganglions adjacents. Généralement, ces lésions se ramollissent et guérissent. De fortes doses de 1 à 15 milligrammes en injections intraveineuse chez le lapin ou intrapéritonéale chez le cobaye provoquent une tuberculose généralisée et fatale pour la plupart des animaux. Des doses moins fortes provoquent des lésions tuberculeuses irrégulièrement disséminées et régressives dans les poumons et la plèvre du lapin et dans l'épiploon, le foie, la rate, et les ganglions lymphatiques du cobaye. Les variétés S et R des bacilles Puntoni peuvent végéter en symbiose dans ces organes pendant plus d'un an sans provoquer de tuberculose généralisée.

#### V. — *BCG (Bacille Calmette-Guérin), souche atténuée de bacilles bovins.*

La souche BCG 447-51 utilisée, pour cette étude, était de nature essentiellement R. Dans le but de provoquer la dissociation, 12 cobayes, pesant de 223 à 295 grammes ont été inoculés dans un ganglion cervical avec environ 1 milligramme d'une culture de BCG sur pomme de terre glycérinée, âgée de quatre semaines. Pendant les deux premières semaines après l'inoculation, un total de 176 tubes de milieu de Löwenstein ont étéensemencés avec le culot de sang de 22 ponctions cardiaques. Après huit semaines à 37°5, 76 tubes, soit 43,2 p. 100, ont été trouvés positifs et renfermaient 1 à 152 colonies par tube. L'examen d'environ 2.000 colonies distinctes a permis de dénombrer 384 colonies S typiques, soit 19 p. 100, 68 colonies Ch typiques, soit 3,4 p. 100 et les 78,4 p. 100 restants des colonies R typiques (Tableau I).

*Variété S de BCG (Planche XVI, fig. 1 à 6; planche XVII, fig. 7 à 11 et planche XX, fig. 20 et 21). —* Les colonies S obtenues par hémocultures sur le milieu de Löwenstein ou en subcultures sur milieux solides ou liquides ressemblent, sous la plupart des rapports, aux variétés S précédemment décrites.



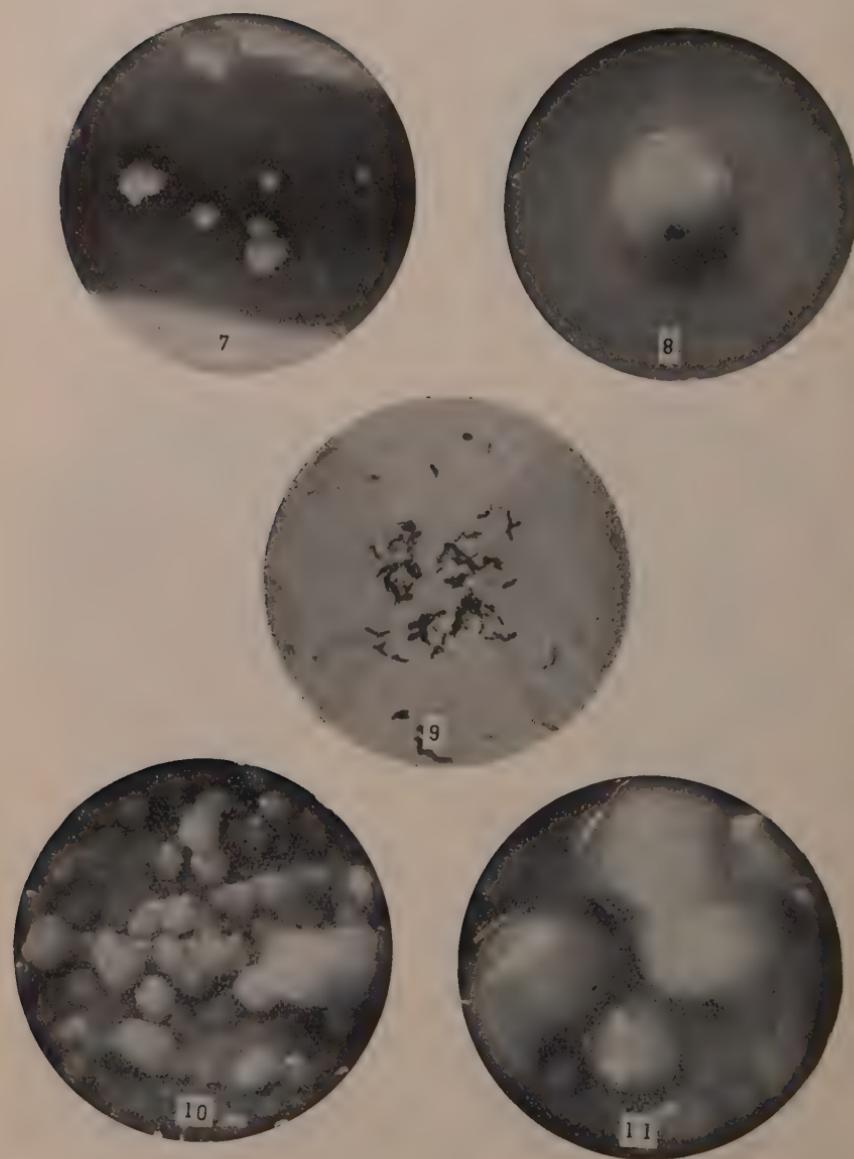


PLANCHE XVII.

Aucun critérium ne permet d'identifier, par l'aspect des colonies, les variétés S aviaires, bovines et humaines, virulentes ou non. Le BCG ne fait pas exception à cette règle. La variété S de BCG pousse assez lentement sur les milieux artificiels à 37° et à la température du laboratoire. La croissance la plus abondante et la plus humide se fait sur milieu de Lœwenstein à 37°5 (Pl. XVII, fig. 10 et 11). Une seule colonie S d'origine, de 1 mm. 2 de diamètre ensemencée au centre d'un tube de milieu de Lœwenstein et laissée au laboratoire, s'est développée durant quatorze mois pour atteindre 17×25 millimètres de diamètre. Pendant cette période, aucune pigmentation ne s'est manifestée. Sur pomme de terre glycérinée et biliée, la croissance est très lente, mais abondante, contrairement aux indications de Petroff [28]. En milieu de Sauton et bouillon glycériné ( $pH = 7,4$ ), l'évolution diphasique se produit et le voile est extrêmement humide, plat et bosselé (Pl. XX, fig. 20 et 21). Une odeur de moisI se révèle dans ces deux milieux. La courbe de  $pH$  descend rapidement vers l'acidité pour atteindre 4,0 après une incubation de dix semaines à 37°5 (Graphique 2). En bouillon ordinaire sans glycérine, l'évolution diphasique est incomplète. Il se produit une culture diffuse avec forte séédimentation au fond et le long des parois du ballon, pendant huit semaines à 37°5, sans tendance à la formation du voile. Au cours de la neuvième semaine, quelques îlots extrêmement minces, d'un blanc-grisâtre mat apparaissent à la surface. Pendant les trois mois suivants, ces îlots ne réussissent pas à se rejoindre pour former un voile continu et le milieu reste trouble. Aucune pigmentation n'est transmise au liquide pendant une incubation de dix semaines. Quand une parcelle du voile S d'une culture de Sauton, âgée de quatre semaines, est ensemencée à la surface d'un ballon de milieu de Sauton, sans qu'elle s'émulsionne, le phénomène de croissance diphasique ne se produit pas à 37°5 et la parcelle se développe rapidement jusqu'à recouvrir la surface entière. Ce développement du voile se fait absolument de la même façon que si la première phase de croissance diffuse avait précédé sa formation. La courbe de  $pH$  vire plus lentement vers la neutralité ou l'acidité que lors d'une croissance monophasique. Quand ce voile est émulsionné, il produit un trouble uniforme ; ensemencé sous

cette forme en milieu de Sauton, l'évolution diphasique s'opère, avec formation rapide d'acide.

Les limites du *pH* pour la croissance de la variété S de BCG en milieu de Sauton tamponné, sous le volume de 150 cent. cubes, vont de 4,0 à 9,0. Au-dessous de *pH* 5,5 et au-dessus de *pH* 8,5, il ne se produit pas de voile, en dépit de la croissance diffuse dans le milieu, au fond et le long des parois du ballon. Les *pH* optima se trouve entre 7,0 et 7,5 pour lesquels les poids respectifs de bactilles séchés sont : 1,523, 1,686 pour 150 cent. cubes de milieu de Sauton, après dix semaines à 37°5. A *pH* = 4,0, on n'obtient que 0 gr. 486, et approximativement le même poids à *pH* = 9,0 (Tableau V). En anaérobiose stricte, toute croissance cesse.

La décomposition des glucides par la variété S de BCG est similaire à celle des souches décrites plus haut, à l'exception du fait que le lactose est atténué irrégulièrement avec production d'acide. L'action bactériostatique des colorants et des désinfectants de même que l'action bactéricide de la chaleur sont également similaires (Tableaux VI et VII). La mobilité électrophorétique est 0,4, 0,5, 0,3 et 0,5 micra par seconde, par volt-centimètre, pour des cultures âgées respectivement d'une, deux, trois et quatre semaines, comme pour les autres variétés S (Tableau VIII). L'agglutination acide se fait à *pH* = 2,4, ce qui correspond à la concentration qui agglutine les variétés S des bactilles des mammifères (Tableau IX).

Les bactilles de la variété S de BCG sont acido-résistants, Gram-positifs, longs, minces, droits ou légèrement incurvés, fortement granuleux. On trouve parmi eux de nombreux bactilles en forme de massue ainsi que de nombreux bactilles non acido-résistants (Pl. XVI, fig. 6 et pl. XVII, fig. 9). Ces derniers sont plus nombreux dans les jeunes cultures. Les bactilles individuels mesurent de 0,5  $\mu$  à 6,5  $\mu$  de long et 0,2  $\mu$  à 0,6  $\mu$  de large. Les dimensions moyennes de 1.000 bactilles sont 2,2  $\mu$  de longueur et 0,4  $\mu$  de largeur (Tableau II). Nous n'avons pas observé de formes ramifiées typiques. Environ 10 p. 400 des bactilles sont complètement décolorés, en dix minutes, par l'acide sulfurique à 20 p. 100.

Les subcultures de 32 passages bi-mensuels sur milieu de Lœwenstein, pomme de terre glycérinée et milieu de Sauton

TABLEAU IX. — Agglutination acide des variétés R et S dissociées des types aviaire, bovin et humain des bacilles tuberculeux.

(Lecture après deux heures au bain-marie à 40°.)

TYPES ET VARIÉTÉS	pH DES SOLUTIONS ACIDES											
	2,4	2,8	3,2	3,6	4,0	4,4	4,8	5,0	6,8	7,0	7,2	7,4
Av. Ninni R <sub>6</sub> . . .	++	++	++	++	++	++	++	++	—	—	—	—
Av. Ninni S <sub>6</sub> . . .	++	++	++	++	++	++	++	++	—	—	—	—
Av. « B » R <sub>4</sub> . . .	++	++	++	++	++	++	++	++	—	—	—	—
Av. « B » S <sub>4</sub> . . .	++	++	++	++	++	++	++	++	—	—	—	—
Bov. Vallée R <sub>7</sub> . . .	++	++	++	++	++	—	—	—	—	—	—	—
Bov. Vallée S <sub>7</sub> . . .	++	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Bov. BCG R <sub>14</sub> . . .	++	++	++	++	++	—	—	—	—	—	—	—
Bov. BCG S <sub>14</sub> . . .	++	++	++	++	++	—	—	—	—	—	—	—
Hum. Anna R <sub>5</sub> . . .	++	++	++	++	++	++	++	—	—	—	—	—
Hum. Anna S <sub>5</sub> . . .	++	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Hum. Ratti R <sub>4</sub> . . .	++	++	++	++	++	++	++	—	—	—	—	—
Hum. Ratti S <sub>4</sub> . . .	++	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Atyp. Puntoni R <sub>5</sub> . . .	++	++	++	++	++	++	—	—	—	—	—	—
Atyp. Puntoni S <sub>5</sub> . . .	++	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Atyp. Bécret R <sub>5</sub> . . .	++	++	++	++	++	++	—	—	—	—	—	—
Atyp. Bécret S <sub>5</sub> . . .	++	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—

+ indique le degré d'agglutination.

ont montré une stabilité remarquable *in vitro* de la variété S. Bien que plusieurs subcultures sur pomme de terre glycérinée aient paru plus mates et plus ondulées que les cultures initiales, nous n'avons pas obtenu de dissociation réversible dans nos subcultures. Sur les cultures en milieux liquides ou solides, laissées au laboratoire et à la lumière pendant plusieurs mois, après incubation préalable de trois à quatre semaines à 37°5, nous avons pu isoler des colonies de variétés R et Ch qui, transplantées, sont restées pures d'aspect et de caractères biologiques. Nous n'avons pas réussi à produire la dissociation par le sérum de lapin anti-S, à moins de laisser les ballons pendant de très longues périodes (de trois à neuf mois) ou à l'étuve, ou au laboratoire. Des ballons témoins contenant ou non du sérum de lapin normal ont donné des résultats presque analogues. *In vivo*, nous avons fréquemment isolé, sur les cultures de tissus provenant d'animaux injectés avec la variété S, un petit nombre de colonies R et Ch. Bien que ces dernières aient montré

une forte stabilité dans leurs subcultures, la variété R s'est changée à nouveau en variété S, après nouvelle inoculation aux animaux. Par contre, la variété Ch semble être d'une stabilité parfaite.

Variété R de BCG. (*Planche XVIII, fig. 12 à 16 et planche XX, fig. 20 et 21*). — Les colonies R de BCG relativement plus grandes, d'aspect cireux et de forme enroulée, ressemblent aux colonies R décrites précédemment. (Pl. XVIII, fig. 13, 15 et 16). La partie centrale se pigmente avec l'âge en jaune orange clair, tandis que la colonie elle-même reste toujours sèche et friable. La croissance sur les milieux solides et en milieux liquides est plus rapide que celle de la variété S. Au laboratoire on n'observe pas de croissance appréciable, aucune culture en milieux liquides sans glycérine à 37°5. En milieu de Sauton et bouillon glycériné ( $pH = 7,4$ ), culture en voile épais, surélevé, crevassé, sec et pigmenté d'ocre léger. (Pl. XX, fig. 20 et 21). Le milieu devient légèrement opaque ou jaune-paille.

La courbe du  $pH$  évolue vers l'alcalinité pendant dix semaines à 37°5. (Graphique 2). Les limites de  $pH$  pour la croissance en milieu de Sauton tamponné vont de 5,5 à 8,5. Les limites optima se trouvent entre  $pH = 6,5$  et 7,5 et pour ces concentrations les poids de bacilles séchés sont respectivement de 1 gr. 845 et 1 gr. 742 par 150 cent. cubes de milieu, après une incubation de dix semaines à 37°5. (Tableau V.) L'odeur douceâtre de fruit, qui se dégage du liquide, contraste avec l'odeur de moisI produite par la variété S. En anaérobiose stricte, toute croissance se trouve arrêtée..

L'assimilation des glucides, la résistance aux colorants et désinfectants et la résistance à l'action bactéricide de la chaleur sont identiques à celles des variétés R de bacilles des mammifères. (Tableaux VI et VII.) La mobilité électrophorétique, également similaire, est de 0,45, 0,6, 1,1 et 0,7 micra par seconde, par volt-centimètre pour les cultures âgées respectivement de un, deux, trois et quatre semaines. (Tableau VIII.) De même, l'agglutination acide se fait à  $pH = 4,4$ , en contraste avec  $pH = 2,4$  pour la variété S. (Tableau IX.)

L'émulsion de la variété R se fait aussi difficilement que celle des autres variétés R. L'examen au microscope révèle des

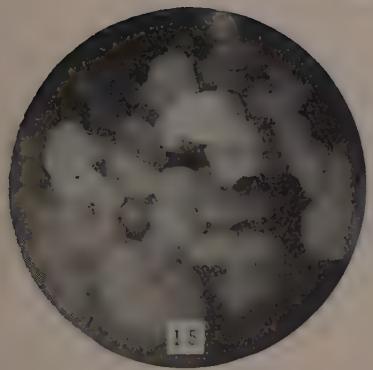
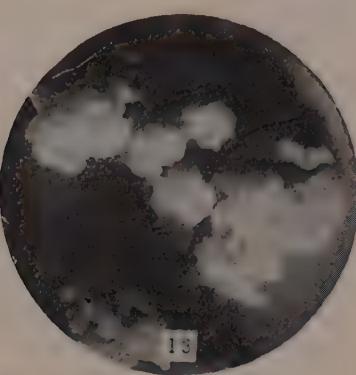
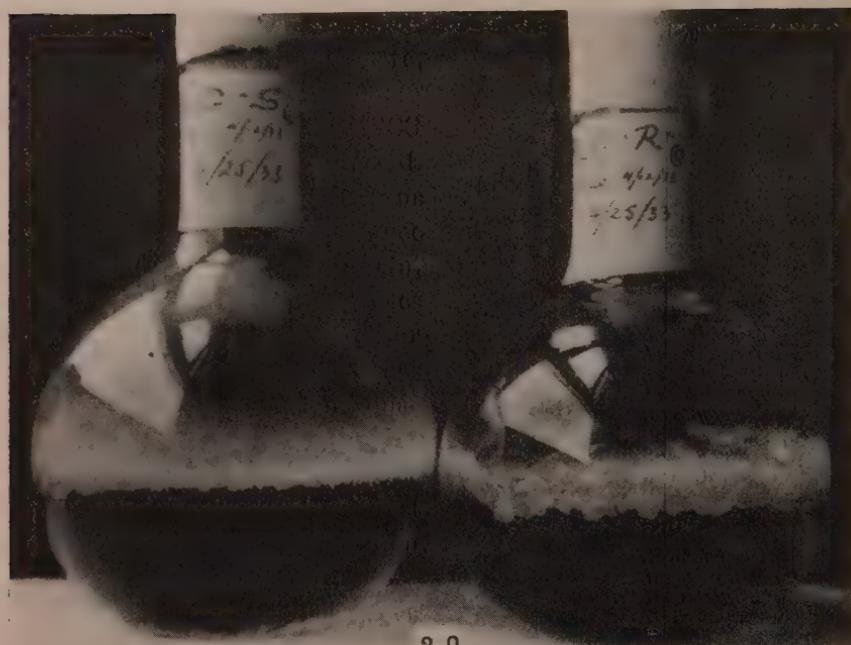
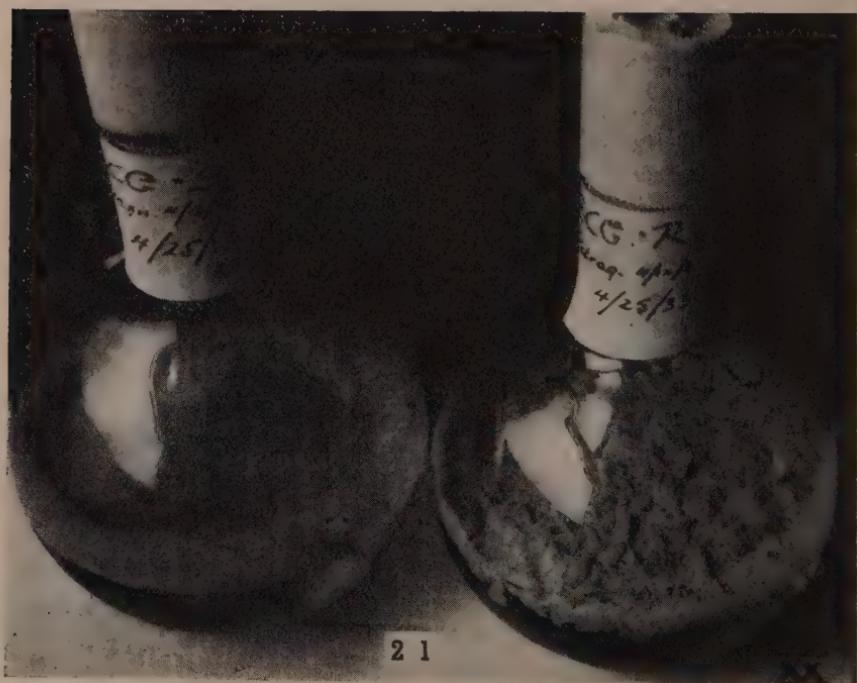


PLANCHE XVIII.



20

XX



21

bâtonnets fortement acido-résistants et Gram-positifs, de forme longue, minces, essentiellement granuleux, droits ou légèrement incurvés, avec un grand nombre de bacilles en forme de massue. (Pl. XVIII, fig. 14.) Les bacilles isolés mesurent de 0,5  $\mu$  à 7,4  $\mu$  de long et 0,3  $\mu$  à 0,5  $\mu$  de large. Les dimensions moyennes de 1.000 bacilles sont 2,9  $\mu$  de longueur et 0,3  $\mu$  de largeur. (Tableau II.) Quelques rares bacilles ont été décolorés complètement, en dix minutes, par l'acide sulfurique à 20 p. 100. Aucune forme ramifiée typique n'a été observée.

La stabilité de la variété R de BCG a été très grande *in vitro* au cours de trente-deux passages bimensuels sur les milieux de Lœwenstein, pomme de terre glycérinée et Sauton. A deux reprises seulement, nous avons réussi à isoler des colonies S typiques d'un voile sur milieu de Sauton qui était resté au laboratoire et à la lumière pendant dix semaines, après une incubation préalable de quatre semaines à 37°5. En tout, 14 colonies S typiques ont pu être isolées dans deux ballons de Sauton. Il ne nous a pas été possible d'obtenir une seule colonie S d'une série de 24 ballons de Sauton auxquels avaient été ajoutés 10 à 20 p. 100 de sérum de lapin anti-R, des bacilles R morts, des filtrats de culture R ou de morceaux stériles de reins, de foie et de rate provenant de lapins immunisés par inoculation de variété R tuée par la chaleur. D'autre part, nous avons pu provoquer avec régularité *in vivo* de la dissociation spontanée de colonies R en S et Ch dans des cultures faites avec les organes de cobayes et de lapins inoculés avec la variété R.

*Variété Ch de BCG.* (Planche XIX, fig. 17 à 19). — Les colonies de la variété Ch de BCG ressemblent en tous points à celles de la même variété des bacilles des mammifères. Les bacilles Ch mesurent de 0,7  $\mu$  à 6,2  $\mu$  de long et 0,4  $\mu$  à 0,6  $\mu$  de large. Les dimensions moyennes de 1.000 bacilles sont 2,4  $\mu$  de longueur et 0,5  $\mu$  de largeur. Presque 20 p. 100 des bacilles sont décolorés complètement, en dix minutes, par l'acide sulfurique à 20 p. 100.

La stabilité de la variété Ch de BCG est la même que celle des bacilles aviaires et des mammifères *in vitro* et *in vivo*. Une seule fois seulement, nous avons isolé des variétés R et S sur une culture de la rate d'un cobaye inoculé par voie intrapéri-

tonéale avec 10 milligrammes provenant d'une culture sur pomme de terre glycérinée, de douzième passage sur le même milieu. L'animal a été tué le quatre-vingt-dix-huitième jour et n'a présenté aucune infection tuberculeuse. Les cultures du foie, des poumons et de la moelle osseuse sont restées négatives. Celles de la rate ont donné 4 colonies R et 3 colonies S contre 420 colonies Ch. Les cultures de ces colonies R et S sont restées stables sur le milieu de Lœwenstein et sur pomme de terre glycérinée pendant dix repiquages bimensuels, avec les caractères biologiques et physiques des variétés R et S typiques. C'est le seul exemple de notre expérience où la variété Ch ait donné naissance à des colonies de variété R et S.

Il n'existe aucun caractère morphologique permettant de différencier entre eux les bacilles des variétés Ch, R et S de BCG. Nous avons observé cependant que les variétés Ch et S renferment autant de formes granuleuses que la variété R. Ceci n'est pas le cas pour les variétés Ch et S de type Aviaire et autres types des mammifères, dans lesquels, de façon générale, nous avons trouvé ces variétés colorées de façon homogène.

#### PROPRIÉTÉS PATHOGÈNES DES VARIÉTÉS CH, R ET S DE BCG.

La variété R de BCG est absolument avirulente pour le cobaye et le lapin aux doses qui, pour d'autres bacilles tuberculeux, sont mortelles. Aux doses énormes de 10 à 50 milligrammes, elle provoque la formation de tubercules typiques qui présentent une tendance spécifique à la caséification et à la résorption rapide, plutôt que l'image habituelle des cellules épithélioïdes multipliées, avec une zone périphérique de lymphocytes et des cellules géantes centrales. La variété S a montré une virulence initiale relative pour le cobaye et le lapin, inoculés respectivement par voie intrapéritonéale et intra-veineuse, avec de fortes doses (1 à 15 milligr.), d'une culture de premier ou de second repiquage, après dissociation. Les mêmes doses injectées par voie sous-cutanée provoquent seulement un foyer caséux localisé qui guérit toujours. Cette virulence initiale relative n'est rendue manifeste qu'après inoculation par voie intrapéritonéale ou intra-veineuse. Des tubercules miliaires se forment dans le foie et la rate du cobaye

et dans les poumons et parfois dans le foie, la rate, les reins et les articulations du lapin. Ces lésions ne peuvent pas être transmises en série, puisque la virulence initiale a disparu après le premier ou second passage. Pendant trente et un passages bimensuels de la variété S sur les milieux de Lœwenstein, pomme de terre glycérinée et de Sauton, cette variété est restée avirulente pour les animaux d'expériences. Une dose allant jusqu'à 50 milligrammes, injectée par voie sous-cutanée au cobaye et au lapin ne provoque qu'une tuberculose localisée et guérissable. Les injections par voie intraveineuse ou intrapéritonéale de 5 à 20 milligrammes provoquent une septicémie généralisée de type Yersin, comme celle déjà mentionnée plus haut pour les variétés de bacilles des mammifères et entraînant parfois la mort en deux à six semaines, avec hyperplasie concomitante du foie, de la rate et des ganglions lymphatiques et congestion des poumons. Tous ces organes fourmillent de bacilles acido-résistants. Chez les animaux qui ont survécu, on peut retrouver les bacilles restés vivants dans les organes internes encore deux cent dix jours après l'inoculation, alors qu'il n'existe aucune formation tuberculeuse ou d'autres signes d'infection. Le passage de notre souche S chez les animaux n'a pas augmenté sa virulence.

La variété Ch, injectée par voie veineuse aux doses énormes de 10 à 50 milligrammes provoque des manifestations toxiques graves chez le lapin et le cobaye, amenant la bacilleose généralisée et non folliculaire de type Yersin. Les doses de 0 milligr. 1 à 1 milligr. 0 en injection intraveineuse, sont tolérées sans dommage. Les bacilles de la variété Ch sont retrouvés vivants dans les organes jusqu'à cent quatre-vingt-quatre jours après l'inoculation, en dehors de toute lésion tuberculeuse.

#### VI. — *Bechet, souche humaine atténuée.*

La souche Bechet a été isolée par MM. Nègre, Valtis et Guy Larroche des urines d'un malade atteint de néphrite hématurique et classée comme souche humaine.

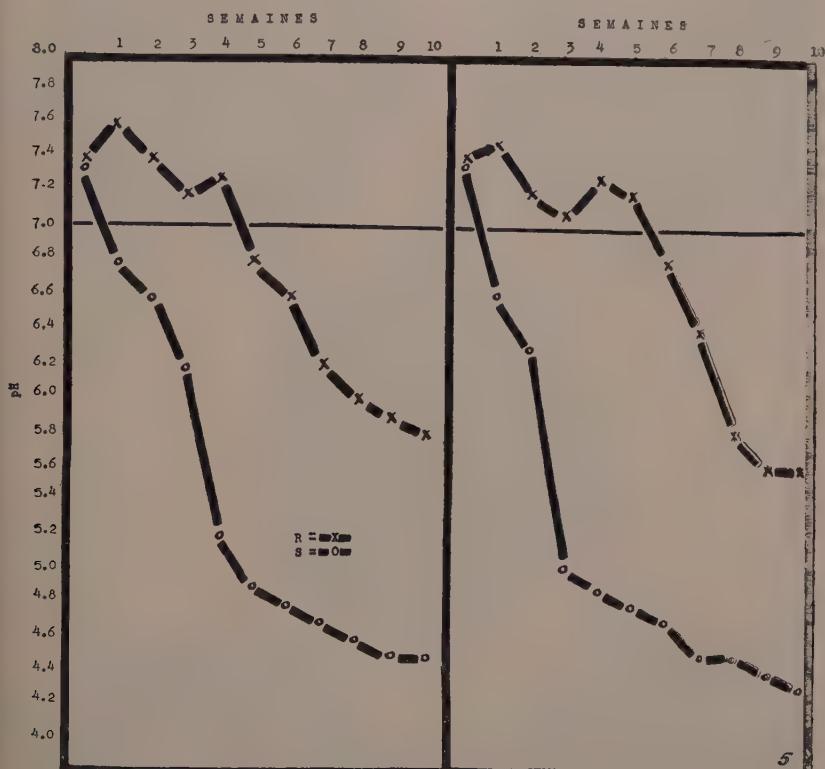
Au cours de deux années de culture sur pomme de terre glycérinée, sa virulence s'est fortement atténuée et elle ne pro-

voque plus qu'irrégulièrement une tuberculose évolutive chez le cobaye, après inoculation intrapéritonéale de 10 milligrammes ou plus. Au début de la présente étude, cette souche était essentiellement de nature R. Dans le but de provoquer la dissociation *in vivo*, nous avons inoculé dans le ganglion lymphatique cervical 6 cobayes pesant de 264 à 328 grammes 1 milligramme d'une culture sur milieu de Löwenstein âgée de quatre semaines. Un total de 96 tubes ont été ensemencés avec le culot de sang de 16 ponctions cardiaques, pratiquée de deux heures à vingt-quatre jours après l'inoculation. Après huit semaines à 37°5, nous avons trouvé 42 tubes positifs, soit 43,8 p. 100. Le nombre de colonies isolées par tube a varié de 1 à 34. Le total approximatif de colonies a été de 256, dont 21, soit 8,2 p. 100 étaient des colonies S typiques et les autres, 91,8 p. 100, des colonies R typiques. Aucune colonie Ch n'a pu être isolée dans cette série.

*Variété S Bechet (planch. XXI, fig. 1 à 5; planche XXIII, fig. 11 et 12).* — Les colonies de la variété S sur le milieu de Löwenstein et pomme de terre glycérinée sont, la plupart du temps, hémisphériques, humides, luisantes et d'une couleur blanc-crèmeux (pl. XXI, fig. 1 à 4).

La variété S à forme plate et étendue est excessivement rare dans cette souche. Un large ensemencement sur milieu de Löwenstein et pomme de terre glycérinée a donné une formation cónfluente ressemblant à du beurre. Quant aux autres caractères de culture, ils ressemblent à ceux des autres variétés S des bacilles des mammifères. La courbe du pH en milieu de Sauton a une tendance nette vers l'acidité au cours de la quatrième semaine, et après dix semaines à 37°5 le pH varie entre 4,4 et 4,8 (tableau III). Les limites de pH pour la croissance vont de 4,0 à 8,0 et la croissance optimum se fait entre pH = 6,0 et 7,0, points auxquels il a été obtenu respectivement 1 gr. 973 et 2 gr. 143 de bacilles séchés, pour 100 cent. cubes de milieu de Sauton, après dix semaines. Au-dessous de pH = 5,5 et au-dessus de pH = 8,0, il ne se produit pas de voile (tableau V). En anaérobiose stricte, toute croissance cesse. La décomposition des glucides, la résistance aux colorants et désinfectants et la résistance à l'action bactéricide de la chaleur ainsi que la mobilité électrophorétique et l'agglutination acide

(tableaux VI, VII, VIII et IX) sont exactement comparables à celles des variétés S des bacilles des mammifères. On trouve parfois des bâtonnets granuleux et en forme de massue disséminés parmi les autres bacilles en nombre dominant, colorés de façon homogène, fortement acido-résistants, Gram-positifs,



Bovine Vallée S<sub>44</sub> et R<sub>44</sub> sur le milieu de Sauton auquel a été ajouté 10 p. 100 de sérum anti-R  
Bovine Vallée de lapin. Lecture hebdomadaire du pH.

Bovine Vallée S<sub>44</sub> et R<sub>44</sub> sur le milieu de Sauton auquel a été ajouté 10 p. 100 de sérum anti-S  
Bovine Vallée de lapin. Lecture hebdomadaire du pH.

GRAPHIQUE 5.

droits pour la plupart (pl. XXI, fig. 5) et mesurant de 0,4  $\mu$  à 5,4  $\mu$  de long et 0,2  $\mu$  à 0,5  $\mu$  de large. Les dimensions moyennes de 1.000 bacilles sont 2,1  $\mu$  de longueur et 0,3  $\mu$  de largeur (tableau II). Environ 20 p. 100 des bacilles sont déco-

lorés complètement en dix minutes par l'acide sulfurique à 20 p. 100. Aucune forme ramifiée typique n'a été observée. Dans les jeunes cultures, on trouve beaucoup de bacilles non acido-résistants.

L'instabilité de cette variété S Bechet est la plus prononcée de toutes les souches étudiées. La culture S initiale est restée stable durant sept repiquages mensuels sur le milieu de Löwenstein et quatre repiquages mensuels sur pomme de terre glycérinée. Ensuite la dissociation spontanée des colonies S en R s'est produite *in vitro* avec régularité, ou partiellement, ou totalement. La même fréquence de dissociation spontanée a été observée *in vivo*. En aucun cas on n'a pu isoler une colonie Ch parmi les nombreuses colonies R et S. Les cultures S, isolées au moyen du micro-manipulateur directement sur milieu de Löwenstein ont conservé l'aspect caractéristique durant neuf repiquages bimensuels sur ce milieu. Nous continuerons à les observer pour établir le cycle vital de cet organisme.

Variété R Bechet (*planche XXII*, fig. 6 à 10; *planche XXIII*, fig. 11 et 12). — Les colonies de la variété R Bechet, d'aspect sec, crevassées, enroulées irrégulièrement et très friables sont similaires sous presque tous les rapports aux colonies des variétés R des bacilles aviaires et des mammifères (pl. XXII, fig. 6, 7, 8 et 9). Sur les vieilles cultures, il se produit une pigmentation centrale orange qui se transmet graduellement à toute la culture. On y remarque aussi un bord humide à la base d'un grand nombre de colonies R. A première vue, ceci semble être une formation de variété S, mais par réensemencement sur d'autres milieux on retrouve des colonies R typiques. Les caractéristiques culturales de cette variété sont essentiellement les mêmes que celles décrites par les colonies R des bacilles des mammifères (pl. XXIII, fig. 11 et 12). La courbe du pH en milieu de Sauton et bouillon glycériné tend à descendre à 6,8, 7,0 pendant les cinq à six premières semaines, mais remonte habituellement à 7,8 ou 8,0 après dix semaines à 37°5 (tableau III). Les limites optima de pH pour la croissance sont 7,0 et 7,5, points auxquels on obtient respectivement 1 gr. 814 et 1 gr. 866 de bacilles séchés pour 150 cent. cubes de milieu de Sauton, après dix semaines de culture à l'étuve.



PLANCHE XXI.

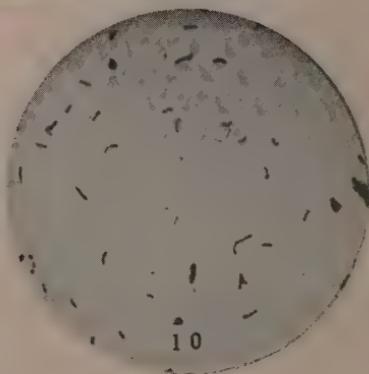


PLANCHE XXII.



11

XXIII.



12

XXIV.

PLANCHE XXIII.

Aucune croissance n'a lieu en milieu de Sauton tamponné ou bouillon glycériné tamponné au-dessous de  $pH = 5,5$ , ni au-dessus de  $pH = 8,0$  (tableau V). En anaérobiose stricte, toute croissance s'arrête. L'assimilation des glucides, la résistance aux colorants et désinfectants et la résistance à l'action bactéricide de la chaleur, ainsi que la mobilité électrophorétique et l'agglutination acide (tableaux VI, VII, VIII et IX) sont identiques à celles des variétés R des bacilles des mammifères.

Comme les autres variétés R, cette souche s'émulsionne difficilement. Les bacilles fortement acido-résistants et Gram positifs, de forme longue, minces, très granuleux, sont mélangés à de rares bacilles en forme de massue et quelques rares bacilles non acido-résistants (pl. XXII, fig. 10). Les dimensions extrêmes des bacilles sur culture de Lœwenstein âgée de quatre semaines, sont de  $0,5 \mu$  à  $7,2 \mu$  de long et  $0,2 \mu$  à  $0,5 \mu$  de large. Les dimensions moyennes de 1.000 bacilles sont  $2,8 \mu$  de longueur et  $0,4 \mu$  de largeur (tableau II). Aucune forme ramifiée typique n'a été observée. La plupart des bacilles résistent à la décoloration, en dix minutes, par l'acide sulfurique à 20 p. 100.

L'instabilité de la variété R a été observée pour la première fois *in vitro* après que la souche eût été réensemencée pendant neuf mois sur milieu de Lœwenstein et pendant sept mois sur pomme de terre glycérinée. A ce moment, la dissociation spontanée s'est produite avec régularité, ou partiellement, ou totalement de R en S. Cette curieuse facilité de dissociation spontanée a été également observée dans la culture de stock qui n'a pas été employée pour les expériences de dissociation. La même observation a été faite par Nègre et Valtis [41], qui ont également étudié cette souche. Il est prématûré d'exprimer une opinion quant à l'instabilité des cultures R sur milieu de Lœwenstein à partir d'éléments isolés au moyen du micro-manipulateur ou *in vivo*. Comme les cultures unicellulaires de la variété S, elles ont gardé leur forme pendant neuf passages bimensuels sur milieu de Lœwenstein. Cependant les premières subcultures à partir des organes infectés ont, jusqu'à présent, donné naissance à au moins 3 colonies S typiques parmi environ 400 colonies R. La facilité de dissociation *in vivo*

de R en S a déjà été soulignée. Ces observations nous incitent à croire que la dissociation spontanée de R en S d'une culture R unicellulaire se produit avec la souche *Bechet* de la même façon que pour les souches de bacilles aviaires et des mammifères.

#### PROPRIÉTÉS PATHOGÈNES DES VARIÉTÉS R ET S BECHET.

Nos résultats concordent essentiellement avec ceux déjà publiés par Nègre et Valtis [41], à savoir que les cultures des premiers passages de la variété S, injectées par voie sous-cutanée au cobaye ne provoquent qu'une tuberculose localisée et guérissable, tandis que chez le lapin et le cobaye, 0 milligr. 01 par voie intraveineuse provoque une infection généralisée du type Yersin, tuant souvent ces animaux en quatre ou six semaines. Au cours des passages ultérieurs, cette toxicité initiale disparaît presque complètement. La variété R est relativement avirulente par voie sous-cutanée chez le cobaye, tandis que les injections intrapéritonéales de 10 milligrammes provoquent irrégulièrement quelques lésions tuberculeuses disséminées, en particulier dans l'épiploon et dans la rate du cobaye, mais non chez le lapin.

#### Résumé et conclusions.

1<sup>o</sup> Les souches aviaires, bovines et humaines, typiques ou non, des bacilles tuberculeux ne présentent pas de caractères morphologiques fixes, mais se dissocient spontanément en colonies de variétés Ch, R et S. Cette dissociation se produit plus fréquemment *in vivo* qu'*in vitro*. Pour le bacille aviaire, la variété S est le type dominant, les variétés Ch et R sont relativement rares ; pour les bacilles des mammifères, le type dominant est la variété R ; les variétés S et Ch sont plus rares.

2<sup>o</sup> On n'observe pas de stabilité absolue pour aucune de ces variétés. La convertibilité des variétés R en S et vice-versa a été obtenue plus fréquemment *in vitro* et *in vivo* pour ces variétés que pour la variété Ch. Des cultures de Ch, R et S à partir d'un seul bacille ont confirmé cette convertibilité. *In vitro*,

la dissociation a été provoquée le plus souvent dans des cultures en milieux liquides (ballons de 250 cent. cubes) qui, après une courte incubation à 37°5, avaient été laissées au laboratoire (20 à 30° C.). L'addition de sérum de lapin anti-R ou anti-S, ou de tissus provenant d'animaux immunisés avec les variétés R ou S, n'a pas augmenté sensiblement le développement de colonies de variétés S ou R.

3° Les variétés Ch et S des bacilles tuberculeux aviaires et des mammifères, diffèrent essentiellement de la variété R par leur évolution diphasique en milieux liquides glycérinés. Leur croissance se caractérise alors par un développement initial diffus dans la masse du liquide, au fond et le long des parois du flacon, suivi d'une clarification finale du milieu, avec formation d'un voile plat, lisse et crémeux. Cette croissance contraste avec celle de la variété R qui s'opère d'emblée sous la forme d'un voile irrégulier, crevassé et friable. En milieux liquides sans glycérine, le voile de surface des variétés Ch et S ne se produit pas, en dépit d'un développement diffus et abondant.

4° Les variétés Ch et S croissent à la température du laboratoire (20 à 30° C.) sur les milieux solides et les milieux liquides, tandis que la variété R ne se développe qu'à la température de l'étuve (37 à 40°). En anaérobiose stricte, il ne se produit aucun développement des variétés Ch, R et S, ni sur les milieux solides, ni en milieux liquides, glycérinés ou non.

5° Le pH optimum pour la croissance des variétés Ch et S en milieu de Sauton est neutre ou acide, et pour la variété R neutre ou alcalin. Pour les variétés Ch et S, la croissance se produit entre pH 4,0 et pH 9,0, tandis que celle de la variété R se trouve limitée entre pH 5,5 et pH 8,0. Les variétés Ch et S ne forment pas de voile au-dessous de pH = 5,5 ni au-dessus de pH = 8,0, limites qui coïncident avec celles de la formation du voile de R.

6° Pour le type aviaire, la variété R donne une réaction acide en milieu de Sauton, tandis que les variétés S et Ch donnent une réaction alcaline, après dix semaines à 37°5. La variété R des bacilles des mammifères donne une réaction alcaline et les variétés S et Ch une réaction acide dans ce même milieu. Des mélanges de variétés R et S de bacilles aviaires donnent une réaction finale alcaline, due à la croissance rapide et dominante

de la variété S. Des mélanges identiques des variétés R et S de bacilles des mammifères donnent une réaction finale acide, due à la croissance rapide et dominante de la variété S. Cet antagonisme *in vitro* des variétés R et S semble provenir de la présence, dans la variété S, d'une « hormone » bactérienne stabilisatrice ou transformatrice du type.

7° L'assimilation des glucides est essentiellement similaire pour les variétés Ch, R et S des types aviaire et mammifère : glucose, maltose, mannite, lévulose, galactose, fructose, arabinose, tréhalose, glycérine et, parfois, lactose sont assimilés avec production d'acide; le saccharose ne l'est pas. La glycérine à une concentration supérieure à 10 p. 100 en milieu de Sauton entrave la croissance des trois variétés.

8° La variété R des types aviaires et mammifères est plus résistante à l'action bactériostatique des colorants et désinfectants que les variétés Ch et S, tandis que ces dernières résistent mieux à l'action bactéricide de la chaleur, de la lumière, aux conditions de nutrition défavorables et au vieillissement que la variété R.

9° La mobilité électrophorétique est toujours à peu près la même pour les souches de variété S, quelle que soit l'origine et l'âge de la culture. Elle n'est pas uniforme pour les souches de variété R d'origines différentes; elle varie avec l'âge de ces cultures, en passant généralement par un maximum vers la troisième semaine. La mobilité des souches de variété R est toujours supérieure (environ le double) à celle des souches correspondantes de variété S des types aviaires et mammifères.

10° En solution acide tamponnée, la variété S des types bovin et humain est agglutinée à  $pH = 2,4$  à 3,0; la variété R des mêmes types ne l'est qu'à  $pH = 4,2$  à 4,8. La variété S aviaire est agglutinée à  $pH = 3,6$  à 4,0 et la variété R aviaire à  $pH = 6,8$  à 7,2. Ces différences sont nettes pour les variétés R et S des types aviaires et mammifères.

11° La morphologie cellulaire des variétés Ch, R et S des types aviaires et mammifères est trop similaire pour permettre de les différencier entre elles. En général, les bacilles de la variété R sont légèrement plus longs, plus minces et plus granuleux que ceux des variétés Ch et S.

12° Les bacilles des variétés Ch et S du type aviaire et du

type mammifère sont moins acido-résistants que ceux de la variété R.

13° Les variétés Ch et S, du type aviaire et du type mammifère, renferment, par milligramme de culture, approximativement trois à cinq fois plus de bacilles qu'un même poids de variété R.

14° Les bacilles de la variété Ch des types aviaires et mammifères sont généralement avirulents pour les animaux d'expériences. Inoculés à fortes doses par voie veineuse, ils provoquent une bacillose généralisée et non folliculaire, parfois fatale. Les bacilles de la variété S aviaire sont très virulents pour la poule et le lapin et peu virulents pour le cobaye. Les bacilles de la variété R aviaire sont relativement avirulents pour les animaux d'expériences, excepté lorsqu'ils sont inoculés à forte dose par voie veineuse; ils produisent alors une forme chronique de tuberculose miliaire. Les bacilles de la variété S des mammifères sont relativement virulents pour le lapin et le cobaye, par voie péritonéale ou veineuse quand ils proviennent d'un premier ou second passage après la dissociation. Cette virulence disparaît rapidement et de fortes doses injectées par voie veineuse ou péritonéale provoquent une bacillose généralisée dont les animaux guérissent le plus souvent. Des doses égales injectées par voie sous-cutanée ou dermique provoquent des abcès localisés qui guérissent complètement. Les bacilles de la variété R du type mammifère sont virulents pour les animaux d'expériences, ceux du type humain pour le cobaye et ceux du type bovin pour le cobaye et le lapin, chez lesquels ils provoquent une tuberculose évolutive et généralisée. Une exception existe pour la variété R de BCG atténué, qui est sans virulence pour les animaux d'expériences.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] RICHARDS (O. W.) et ROBSON (G. C.). *Nature*, 1926, **117**, p. 345 et 382.
- [2] v. NAEGELE (C.). *Die niederen Pilze*, München, 1877; *Untersuchungen über die niederen Pilze*, München, 1882.
- [3] BUCHNER (H.). *Ueber die exp. Erzeugung d. Milzbrandcont. a. d. Heupilzen*, München, 1883.
- [4] LEHMANN (K. B.) et NEUMANN (R.). *Atlas und Grundriss der Bakteriologie*, Berlin, 1896.

- [5] NEISSE (M.). *Ztbl. f. Bakt.*, I. Abt., Ref., 38, 1906, p. 98.  
[6] MASSINI (R.). *Archiv. f. Hyg.*, 61, 1907, p. 250.  
[7] BAERTHELEIN (K.). *Arb. a. d. Kaisert. Gesundheitsamte*, 40, 1912, p. 433; *Ztbl. f. Bakt.*, Abt. I, Orig., 81, 1918, p. 369.  
[8] ARKWRIGHT (J. A.). *J. Path. and Bact.*, 23, 1920, p. 358; *ibid.*, 24, 1921, p. 36; *ibid.*, 25, 1924, p. 104; *ibid.*, 29, 1926, p. 318; *ibid.*, 30, 1927, p. 345 et 566; *ibid.*, 31, 1928, p. 665; *ibid.*, 32, 1929, p. 229; *Brit. J. Exp. Path.*, 5, 1924, p. 23.  
[9] DEKRUIF (P.). *J. Amer. Med. Ass.*, 76, 1921, p. 654; *J. Exp. Med.*, 33, 1921, p. 773; *ibid.*, 35, 1922, p. 561; *Proc. Soc. Exp. Biol. et Med.*, 19, 1921, p. 34.  
[10] WEIL (E.) et FELIX (A.). *Wien klin. Wchnschr.*, 30, 1917, p. 393 et 4509; *Ztschr. Immun. Forsch.*, Tl. I, Orig., 29, 1920, p. 24.  
[11] COWAN, MARY (L.). *Brit. J. Exp. Path.*, 3, 1922, p. 187; *ibid.*, 4, 1923, p. 241; *ibid.*, 5, 1924, p. 226; *ibid.*, 8, 1927, p. 6.  
[12] GRIFFITH (F.). *Rep. Publ. Health Med. Subj.*, London, n° 18, 1923; *J. Hyg.*, 27, 1928, p. 413.  
[13] REIMANN (H.). *J. Exp. Med.*, 41, 1925, p. 587; *ibid.*, 43, 1926, p. 107; *ibid.*, 45, 1927, p. 807.  
[14] TOPLEY (W.) et AYRTON (J.). *J. Hyg.*, 22, 1924, p. 234 et 305.  
[15] WHITE, BRUCE (P.). *Med. Research Council, Sp. Rep. Series*, n° 91, 1925; *ibid.*, n° 103, 1926; *J. Path. and Bact.*, 30, 1927, p. 113; *ibid.*, 31, 1928, p. 423.  
[16] JULIANELLA (L.). *J. Exp. Med.*, 44, 1926, p. 683 et 735; *ibid.*, 47, 1928, p. 889.  
[17] HADLEY (P.). *J. Inf. Dis.*, 40, 1927, p. 1.  
[18] SOULE (M.). *J. Inf. Dis.*, 42, 1928, p. 93; *ibid.*, 46, 1932, p. 30; *Bulletino. Soc. Intl. di Microbiol.*, 4, 1932, p. 551.  
[19] PETRAGNANI (G.). *Bulletino. Soc. Intl. di Microbiol.*, 4, 1932, p. 288.  
[20] GASPERINI (A.). *Soc. toscana di scienze nat.*, 5, 1895, p. 4.  
[21] NOCARD (E.). *Ces Annales*, 12, 1898, p. 561.  
[22] BANG (O.). *Centralbl. f. Bakt.*, I Orig., 46, 1908, p. 461.  
[23] FERRAN (B.). *Congr. Int. de la Tuberc.*, Paris, 1905, p. 170.  
[24] BAERTHELEIN (K.) et TOJODA (A.). *Centralbl. f. Bakt.*, I Abt., Ref., 57, 1913, p. 281.  
[25] GILDMEISTER (E.). *Centralbl. f. Bak.*, Orig., 86, 1921, p. 513.  
[26] KOLLE (W.), SCHLOSSBERGER (H.) et PFANNENSTIEL (W.). *Deutsche med. Wchnschr.*, 47, 1921, p. 437.  
[27] KAHN (M.). *Am. Rev. Tuberc.*, 20, 1929, p. 450.  
[28] PETROFF (S. A.), BRANCH (A.) et STEENKEN (W.). *Proc. Soc. Exp. Biol. et Med.*, 24, 1927, p. 632, 956; *ibid.*, 25, 1927, p. 14; *Am. Rev. Tuberc.*, 19, 1929, p. 9; *J. Exp. Med.*, 51, 1930, p. 831; *J. Immunol.*, 19, 1930, p. 79; WINN (W. A.) et PETROFF (S. A.). *J. Exp. Med.*, 57, 1933, p. 239.  
[29] KRAUS (R.). *Ztschr. f. Immunitätsforsch.*, 61, 1929, p. 454.  
[30] ELBERT (B.) et GELBERG (S.). *Ces Annales*, 44, 1930, p. 48.  
[31] NECHTADIMENKO (M.), ODRINA (O.), SYSSAK (M.) et ANGUENITSKI (I.). *Ces Annales*, 45, 1930, p. 54.  
[32] TZEKNOWITZER (M.). *Ces Annales*, 45, 1930, p. 162.  
[33] BEGBIE (R. S.). *Edinburg Med. J.*, 38, 1931, p. 174.  
[34] DOAN (C. A.). *Med. Clinics of North America*, 14, 1931, p. 279.  
[35] KAHN (M.) et SCHWARZKOPF (H.). *Proc. Soc. Exp. Biol. et Med.*, 27, 1930, p. 381; *ibid.*, 29, 1932, p. 571; *Am. Rev. Tuberc.*, 23, 1931, p. 45; *J. Bact.*, 25, 1933, p. 457.  
[36] REED (G.) et RICE (C.). *Canad. J. Research*, 4, 1931, p. 389; *ibid.*, 5, 1931, p. 111, 375; *J. Immunol.*, 23, 1932, p. 385.

- [37] MAZUR (B.). *Kazan med. Z.*, **28**, 1932, p. 829.
- [38] CHRISTISON (M.). *Ctbl. f. Bakt., Orig.*, **125**, 1932, p. 73.
- [39] SEIBERT (F.), LONG (E.) et MORLEY (N.). *J. Inf. Dis.*, **53**, 1933, p. 175.
- [40] ZULMANN (F.). *Centralbl. f. Immunitätsforsch.*, **81**, 1933, p. 1.
- [41] NÈGRE (L.), VALTIS (J.) et BONNEFOI (A.). *C. R. de la Soc. de Biol.*, **114**, 1933, p. 1060; *Ces Annales*, **51**, 1933, p. 591.
- [42] VALTIS (J.) et DEINSE (F. VAN). *Ces Annales*, **51**, 1933, p. 419; *ibid.*, **53**, 1934, p. 51; *C. R. de la Soc. de Biol.*, **108**, 1933, p. 669; **111**, p. 371; t. **113**, p. 847.
- [43] SAENZ (A.) et COSTIL (L.). *C. R. de la Soc. de Biol.*, **113**, 1933, p. 1503; **114**, p. 1260, 1263; *ibid.*, **116**, 1934, p. 308.
- [44] ARMAND-DELILLE (P.) et GAVOIS (H.). *C. R. de la Soc. de Biol.*, **112**, 1933, p. 1150.
- [45] SCHNIEDER (E.). *Centralbl. f. Tuberk.*, **68**, 1933, p. 405.
- [46] BIRKHAUG (K.). *Am. Rev. Tuberc.*, **27**, 1933, p. 6; *C. R. de la Soc. de Biol.*, **113**, 1933, p. 726, 814; *ibid.*, **116**, 1934, p. 424; *Ces Annales*, **51**, 1933, p. 428.
- [47] PETROFF (S. A.). *Am. Rev. Tuberc.*, **20**, 1929, p. 275.
- [48] NINNI (C.). *Ces Annales*, **45**, 1930, p. 433.
- [49] LOEWENSTEIN (E.). *Ces Annales*, **50**, 1933, p. 161.
- [50] HADLEY (P.). *J. Inf. Dis.*, **40**, 1927, p. 1; *The Newer Knowledge of Bacteriology and Immunology*, Chicago, 1928, p. 84.
- [51] PIASECKA-ZYLAND (E.). *Ces Annales*, **43**, 1929, p. 1002.
- [52] MOELLERS (B.). *Handb. d. path. Mikroorg.*, Kolle u. Wassermann, **5**, 1928, p. 615.
- [53] EBER (A.). *Centralbl. f. Bak.*, *Orig.*, Abt. I, **70**, 1913, p. 229.
- [54] GRIFFITH (A. S.). *A System of Bacteriology*, London, **5**, 1930, p. 196.
- [55] CHOCROUN (N.) et PLOTZ (H.). *C. R. d'Acad. des Sciences*, **199**, 1934, p. 165.
- [56] STITT (E.). *Practical Bacteriology*, Philadelphia, 1927, p. 691.
- [57] ETINGER-TULCZYMSKA (R.). *Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskr.*, **113**, 1932, p. 762.
- [58] GUNDEL (M.) et MAYER (U.). *Ztbl. f. Bakt., Abt. I, Orig.*, **129**, 1933, p. 305.
- [59] NEUFELD (F.) et KUHN (H.). *Ztbl. f. Hyg. u. Infektionskr.*, **116**, 1934, p. 95.

## LÉGENDES DES PLANCHES

### PLANCHE X

*Variétés de colonies dissociées d'Humaine Anna de Mycobacterium[tuberculosis].*

- FIG. 1. — Hémoculture, cobaye, inoculé dans le ganglion lymphatique cervical avec 1 milligramme Humaine Anna non dissociée; milieu Loewenstein, vingt-deux jours  $\times$  2. A noter, colonie S hémisphérique typique en haut et colonie R irrégulière de dessous.
- FIG. 2. — Variété S de fig. 1; pomme de terre glycérinée, trente jours  $\times$  2.
- FIG. 3. — Frottis de Variété S de fig. 1. Ziehl-Neelsen  $\times$  900.
- FIG. 4. — Variété S, sixième repiquage sur milieu de Loewenstein. Ziehl-Neelsen  $\times$  900. A noter, similitude avec fig. 3.
- FIG. 5. — Variété S, sixième repiquage sur milieu de Loewenstein, six semaines  $\times$  3. A noter, 3 colonies Ch ocre-jaune enclavées dans les colonies S.

## PLANCHE XI

*Variétés de colonies dissociées d'Humaine Anna de Mycobacterium tuberculosis.*

- FIG. 6. — Variété R, sixième repiquage sur milieu de Lœwenstein, six semaines  $\times 3$ .
- FIG. 7. — Frottis de variété R de fig. 6. Ziehl-Neelsen  $\times 900$ . A noter, bâtonnets longs, minces et granuleux.
- FIG. 8. — Frottis de variété R, dixième repiquage sur milieu de Lœwenstein. Ziehl-Neelsen  $\times 900$ . A noter, similitude avec fig. 7.
- FIG. 9. — Variété R, dixième repiquage sur pomme de terre glycérinée, six semaines  $\times 2$ .
- FIG. 10. — Frottis de variété R de fig. 9. Ziehl-Neelsen  $\times 900$ . A noter, abondants granules libres dispersés parmi les bâtonnets longs et minces.

## PLANCHE XII

*Variétés de colonies dissociées d'Humaine Anna de Mycobacterium tuberculosis.*

- FIG. 11. — *A gauche*: Variété S sur milieu Sauton, douze jours. A noter, croissance diffuse avec dépôt le long des parois, sans formation de voile; *A droite*: Variété R sur milieu Sauton, trois semaines. A noter, voile épais et crevassé, milieu clair.
- FIG. 12. — Mêmes que fig. 11 après incubation de cinq semaines. *A gauche*: Variété S. A noter, voile plat et crémeux, milieu clair et dépôt au fond; *A droite*: Variété R. A noter, voile épais et très crevassé, milieu clair, pas de dépôt au fond.

## PLANCHE XIII

*Variétés de colonies dissociées d'Aviaire (?) Puntoni atypique de Mycobacterium tuberculosis.*

- FIG. 1. — Variété S; pomme de terre glycérinée, vingt jours  $\times 3$ .
- FIG. 2. — Variétés S et Ch. Hémoculture cobaye, inoculé dans un ganglion lymphatique cervical, 1 milligramme d'Aviaire (?) Puntoni non dissociée. Milieu Lœwenstein vingt-huit jours  $\times 2$ .
- Fig. 3. — Variété S hémisphérique de fig. 2  $\times 6$ .
- FIG. 4. — Variété S avec bord étalé. milieu Lœwenstein, soixante jours  $\times 3$ .
- FIG. 5. — Frottis de fig. 3. Ziehl-Neelsen  $\times 900$ . A noter, bacilles en forme de massue parsemés entre nombreux bâtonnets droits et courbés.

## PLANCHE XIV

*Variétés de colonies dissociées d'Aviaire (?) Puntoni atypique de Mycobacterium tuberculosis.*

- FIG. 6. — Variété R; pomme de terre glycérinée, vingt jours  $\times 3$ . A noter, contraste avec Planche XIII, fig. 1.
- FIG. 7. — Variétés R et S; hémosticulture cobaye, injecté, ganglion lymphatique cervical, 1 milligramme d'Aviaire (?) Puntoni non dissociée; milieu Lœwenstein, vingt-huit jours  $\times 2$ . A noter, 2 colonies S hémisphériques au centre de 5 colonies R typiques.
- FIG. 8. — Variété R; milieu Lœwenstein, trente-six jours  $\times 3$ .
- FIG. 9. — Même que fig. 8  $\times 10$ . A noter, ressemblance avec fig. 6.
- FIG. 10. — Frottis de fig. 8. Ziehl-Neelsen — 900.

## PLANCHE XV

*Variétés de colonies dissociées d'Aviaire (?) Puntoni atypique  
de Mycobacterium tuberculosis.*

FIG. 11. — *A gauche* : Variété S<sub>o</sub> sur milieu de Sauton, trente jours. A noter, voile plat et crémeux. *A droite* : Variété R<sub>o</sub>, sur milieu de Sauton, trente jours. A noter, voile épais et extrêmement crevassé.

## PLANCHE XVI

*Variétés des colonies dissociées de BCG (447-51).*

FIG. 1. — Variétés R et S; hémoculture, cobaye, inoculé dans un ganglion lymphatique cervical avec 1 milligramme de BCG non dissociée; milieu Löwenstein, huit semaines  $\times 3$ . A noter, colonie centrale lisse et étalée en contact intime avec le milieu, flanquée de 2 colonies R typiques.

FIG. 2. — Même que fig. 1  $\times 6$ .

FIG. 3. — Variété R à gauche et S à droite  $\times 6$ .

FIG. 4. — Variété S plate avec poussées superposées de colonies S hémisphérique  $\times 3$ .

FIG. 5. — Variété R  $\times 10$ .

FIG. 6. — Frottis de fig. 4. Ziehl-Neelsen  $\times 900$ . A noter, les formes des bâtonnets longs, courbes et granuleux.

## PLANCHE XVII

*Variétés des colonies dissociées de BCG (447-51).*

FIG. 7. — Variétés R et S; hémoculture de la même série que Planche XVI, fig. 1; milieu Löwenstein, vingt-huit jours  $\times 2$ . A noter, 4 colonies S très jeunes au centre, entourées de 3 colonies R plus grandes à contours irréguliers.

FIG. 8. — Variété S hémisphérique de fig. 7, huit semaines  $\times 10$ .

FIG. 9. — Frottis de fig. 8. Ziehl-Neelsen  $\times 900$ . A noter, bâtonnets très gra-nuleux.

FIG. 10. — Variété S, milieu Löwenstein, six semaines  $\times 4$ .

FIG. 11. — Même que fig. 10  $\times 10$ . A noter, grande humidité et aspect crémeux.

## PLANCHE XVIII

*Variétés des colonies dissociées de BCG (447-51).*

FIG. 12. — Variétés R et S; hémoculture de la même série que Planche XVI, fig. 1; milieu Löwenstein, huit semaines  $\times 2$ .

FIG. 13. — Variété R de fig. 12  $\times 10$ .

FIG. 14. — Frottis de fig. 13. Ziehl-Neelsen  $\times 900$ . A noter, bâtonnets plus minces que ceux de variété S.

FIG. 15. — Variété R; milieu Löwenstein, huit semaines  $\times 4$ .

FIG. 16. — Même que fig. 15  $\times 10$ . A noter, contraste avec variété S sur même milieu (Planche XVII, fig. 10-11). Sec et forme enroulée.

## PLANCHE XIX

*Variétés des colonies dissociées de BCG (447-51).*

FIG. 17. — Variétés Ch et S ; hémoculture de la même série que Planche XVI, fig. 1 ; milieu de Lœwenstein, six semaines  $\times 2$ . A noter, 3 colonies S étalées entourées de nombreuses colonies Ch hémisphériques.

FIG. 18. — Même que fig. 17  $\times 4$ . A noter, forme étalée de la colonie S avec 3 colonies Ch hémisphériques superposées.

FIG. 19. — Frottis de la colonie Ch à gauche de la fig. 18. Ziehl-Neelsen  $\times 900$ . A noter, bâtonnets courts et très granuleux.

## PLANCHE XX

*Variétés des colonies dissociées de BCG (447-51).*

FIG. 20. — A gauche : Variété S<sub>o</sub> de BCG en milieu de Sauton, six semaines. A noter, voile fin, presque transparent qui grimpe le long de la paroi; liquide clair et dépôt au fond. A droite : Variété R<sub>o</sub> de BCG en milieu de Sauton, six semaines. A noter, voile épais et crevassé; liquide clair sans dépôt au fond.

FIG. 21. — Même que fig. 20; vu d'en haut. A noter, voile S plat et crémeux et voile R épais et crevassé.

## PLANCHE XXI

*Variétés des colonies dissociées d'Humaine Bécret atypique de Mycobacterium tuberculosis.*

FIG. 1. — Variété S; pomme de terre glycérinée, vingt jours  $\times 3$ .

FIG. 2. — Variété S; milieu de Lœwenstein, vingt jours  $\times 2$ .

FIG. 3. — Même que fig. 2  $\times 6$ .

FIG. 4. — Même que fig. 1  $\times 20$  A noter, surface lisse, humide et légèrement ondulée.

FIG. 5. — Frottis de la grande colonie S centrale de fig. 3. Ziehl-Neelsen  $\times 900$ . A noter, bâtonnets très courts et non granuleux.

## PLANCHE XXII

*Variétés des colonies dissociées d'Humaine Bécret atypique de Mycobacterium tuberculosis.*

FIG. 6. — Variété R; pomme de terre glycérinée, vingt jours  $\times 3$ . A noter, contraste avec variété S, Planche XXI, fig. 1.

FIG. 7. — Variété R sur milieu de Lœwenstein, vingt jours  $\times 2$ .

FIG. 8. — Même que fig. 7  $\times 6$ .

FIG. 9. — Même que fig. 6  $\times 20$ . A noter, contraste avec Planche XXI, fig. 4. Surface irrégulière et croûteuse.

FIG. 10. — Frottis de fig. 6. Ziehl-Neelsen  $\times 900$ . A noter quelques bacilles très granuleux entre les bacilles très homogènes.

## PLANCHE XXIII

*Variétés des colonies dissociées d'Humaine Secret atypique  
de Mycobacterium tuberculosis.*

FIG. 11. — *A gauche* : Voile de variété S, milieu Sauton, huit semaines.  
*A droite* : Voile de variété R, milieu Sauton, huit semaines. A noter,  
dépôt au fond du flacon S.

FIG. 12. — Mêmes que fig. 16. Vu d'en haut. A noter, voile S, à gauche, plat,  
humide et légèrement bosselé, avec le voile R, à droite, fortement  
crevassé.

## **CONTRIBUTION EXPÉRIMENTALE A LA QUESTION DE LA SPÉCIFICITÉ DES STREPTOCOQUES**

par R. FREUND.

Depuis plusieurs années, les problèmes biologiques du Streptocoque ont été l'objet de travaux importants : en premier lieu, la *question de l'infection focale*, puis celle des *toxines streptococciques*, dans lesquelles rentre ce que l'on a appelé les *hémolysines streptococciques*. Au cours de recherches sur la biochimie thérapeutique des streptocoques, et à l'occasion de l'étude clinique des affections streptococciques, portant en particulier sur la « streptomycose fluctuante » (1), ces problèmes ont dû être envisagés pour des raisons de méthode et d'étiologie.

A propos du problème de l'infection focale, nous nous sommes d'abord posé la question d'ordre expérimental que voici : *la base de cette doctrine*, c'est-à-dire *l'organotropie spécifique* d'un germe aussi ubiquitaire, aussi variable que le streptocoque, est-elle démontrable par l'expérience ?

Nous avons commencé par répéter sur l'animal les expériences fondamentales de Rosenow, en vue de reproduire une infection streptococcique *spécifique en apparence* et comparable à l'infection de l'homme.

Dans plusieurs essais, il fut procédé exactement selon les indications de Rosenow : on inocula du matériel fraîchement prélevé sur un malade (par exemple, le contenu d'un kyste dentaire d'une personne souffrant de cholécystite) ; mais le plus souvent, contrairement à Rosenow, on veilla tout particulièrement à avoir des germes en culture pure, prélevés directement dans l'organe malade : par exemple, des souches pures obtenues par sondage duodénal sur des sujets atteints de cholécystite ou d'angiocholite. Nous utilisâmes cependant aussi, pour ces essais, des souches obtenues du sang au cours d'une

(1) R. FREUND. *Zeitschr. f. Klin. Med.*, **108**, fasc. 1-3, 1928, p. 300.

poussée aiguë de chorée ou de polyarthrite (1), maladies que l'on peut aussi considérer, suivant cette manière de voir, comme des manifestations de la streptomycose fluctuante. Ces souches provenant de cultures jeunes (seize à vingt-quatre heures) étaient inoculées à des lapins par la voie veineuse. Si elles présentaient un pouvoir pathogène quelconque pour le lapin, ce qui était rare, elles le tuaient en vingt-quatre à soixante-douze heures par septicémie généralisée ; les germes inoculés étaient alors retrouvés dans tous les organes, soit sous la forme initiale, soit sous des formes variables suivant les différents organes (en partie à l'état de streptocoque dit hémolytique, en partie à l'état de streptocoque *viridans* non hémolytique). Si la souche ne provoquait pas de septicémie mortelle, le streptocoque n'était plus obtenu par culture sur l'animal sacrifié et, après vingt-quatre à soixante-douze heures, le germe était « digéré ».

Nous avons alors étudié la question de savoir si une organotropie du streptocoque pouvait être obtenue expérimentalement par culture. Pour obtenir des résultats aussi univoques que possible, nous choisissons des conditions d'expériences extrêmes : diverses souches, dont une provenant du sang d'un choréique, furent inoculées par voie subdurale et par voie endoneurale pour tenter de créer des souches neurotropes. Si la souche présentait quelque virulence à l'égard du lapin, elle pouvait être retrouvée dans tous les organes de l'animal après sa mort. Si l'on inoculait, par voie veineuse, les différentes souches obtenues à partir du sang du cœur, de la rate, du rein, du système nerveux central, les deux éventualités se produisaient de nouveau : tantôt une septicémie généralisée, tantôt — et cela sans règle aucune — la destruction des germes dans l'organisme de l'animal, sans lésion ni infection muette.

La technique fut alors modifiée en ce sens que le passage fut fait d'*organe à organe*, en renonçant à l'inoculation intraveineuse et, partant, à la recherche de souches originellement organotropes : une souche obtenue, par exemple, du système nerveux central était inoculée sous la dure-mère. Nous réussîmes ainsi à obtenir, à partir du troisième passage, des souches

(1) D. M. W., 20, 1924, p. 625.

qui ne se laissaient plus cultiver qu'à partir de *cet organe seulement*, bien qu'elles tuassent l'animal si le mode d'inoculation restait le même. En modifiant le mode d'inoculation, on obtenait de nouveau les résultats variables que nous avons décrits plus haut.

Il résulte de ces essais, d'une part que l'existence de souches originellement organotropes est très improbable; d'autre part, que l'on peut, une fois de plus, démontrer combien imprévisible et inextinguible est aussi la variabilité de ces germes ubiquitaires, *fraîchement isolés de l'organisme malade*; enfin, que l'on peut cependant obtenir de temps à autre, en s'en tenant à un procédé déterminé, des souches adaptées à un organe spécial. Il est vrai que cela ne s'observe que dans des conditions qui ne se reproduisent pour ainsi dire jamais dans la pathologie de l'homme.

Le problème des toxines apparaît d'une complexité encore plus déroutante. Au Congrès de la scarlatine à Koenigsberg, les auteurs les plus autorisés ont exprimé les opinions les plus diverses. Nous avons nous-même pu démontrer, en nous fondant sur l'observation clinique et l'étude bactériologique, que, le moins que l'on puisse dire, c'est qu'on ne saurait revendiquer pour le streptocoque la qualité d'agent spécifique de la scarlatine (1). Nous avons en outre recherché sur la peau, à l'aide de filtrats de cultures microbiennes et de vaccins, les modifications allergiques de l'organisme dans des maladies en relation avec l'infection streptococcique. Il en ressort que l'on ne peut déclencher par les tests cutanés, à l'aide de vaccins ou de filtrats, préparés presque extemporanément et avec le maximum de précautions, aucune réaction pendant la période d'état de la maladie chez les patients atteints d'érysipèle ou de scarlatine, occasionnellement aussi d'angine à streptocoques; cela est vrai non seulement pour les streptocoques obtenus à partir de scarlatineux, mais encore pour les souches d'autres provenances, et également pour les staphylocoques. Pendant la période dite de convalescence, on trouve aussi une sensibilité réactionnelle de la peau diminuée, phénomène qui traduit une normergie non encore rétablie. C'est seu-

(1) Immunité, Allergie et Maladies infectieuses, 2, fasc. 4-5, 1929, p. 418.

lement lorsque tout symptôme objectif, et tout signe subjectif chez les malades capables de s'observer sans idée préconçue, ont disparu que l'on trouve une réaction appréciable (infiltration, congestion) comme chez le sujet sain. *Cette réaction cutanée s'observe alors aussi bien pour les streptocoques d'origines diverses que pour les staphylocoques.* De ces constatations, qui demandent à être étendues à d'autres maladies et dans des conditions différentes, nous tirons cette conclusion qu'il n'existe ni spécificité streptococcique, ni immunité spécifique à l'égard des streptocoques. *Dans les manifestations dues au streptocoque, quelle que soit leur localisation, il semble que ce soit plutôt l'état réactionnel d'un organe ou de l'organisme entier qui est déterminant.*

Pour ce qui concerne l'hémolyse observée sur la gélose au sang, nous pouvons dire, en nous basant sur de nombreux essais, qu'elle n'existe ni au sens physiologique (issue d'hémoglobine hors du stroma), ni en ce sens qu'il serait possible d'isoler régulièrement et d'une façon démonstrative une substance qui pourrait être regardée comme l'agent de la transformation de l'hémoglobine, telle que le streptocoque la produit sur la gélose au sang (1). Il n'est guère nécessaire de rappeler que, pour des recherches de cet ordre, certains rapports quantitatifs dans la composition des milieux de culture, dans l'espèce sanguine, la quantité de microbes, etc..., sont d'une importance décisive, la technique restant par ailleurs la même. Il est de toute façon certain que l'expression « streptocoque hémolytique » ne correspond pas à l'action physiologique de ces germes. Mais il est possible que leur *propriété d'agir sur le sang* joue un rôle non négligeable dans le déroulement des maladies où, après s'être établis en quelque *locus minoris resistentiae*, ils déploient une action et acquièrent une importance pathogénique directe ou indirecte.

*En résumé :* la grande importance du rôle des streptocoques dans nombre de maladies de l'homme ne réside pas dans une multiplicité de races pourvues d'une spécificité

(1) Nous citons ici les travaux de BINGOLD (*Proc. of the Soc. f. exp., Biol. et Med.*, 28, 1930, p. 57; *Folia haematologica*, 42, 2, 1930), et surtout les importantes recherches de J. Idzerda en van Everdingen (*Ned. Tijd. v. Hyg. Mikrob. en Serol.*, 7, 2; *Zeitschr. f. Bakter.*, 123 et 124, 1, 1932), qui ont ouvert de nouvelles voies paraissant pleines de promesses.

étiologique ou organotropique ; mais, d'une façon générale, dans leur ubiquité, leur grande variabilité entre les états de saprophytisme et de virulence plus ou moins élevée, enfin dans la propriété qu'ils ont de se fixer secondairement dans la plupart des maladies, causant ainsi des complications et des affections surajoutées. De ce fait, l'étude de la lutte contre le streptocoque acquiert une signification qui ne le cède en rien à celle de la lutte contre les plus grands fléaux de l'humanité.

**UN NOUVEAU VECTEUR DANS LA TRANSMISSION  
DES HÉMOPARASITES DES ANIMAUX DOMESTIQUES :  
*ORNITHODORUS LAHORENSIS*, NEUMANN, 1908**

par M<sup>me</sup> A. F. RASTÉGAIEFF.

(Laboratoire de Parasitologie de l'Institut vétérinaire de Lénin-grad. Chef du laboratoire : Professeur W. L. YAKIMOFF.)

Deux savants américains, Th. Smith et Kilborne (1889), découvrirent aux États-Unis que l'agent étiologique de la Texas fever des bovidés est l'hémoparasite *Piroplasma bigemimum*, transmis par la tique *Boophilus annulatus*. Cette découverte stimula l'étude des tiques ou *Ixodoidea*, en particulier celles de la famille des *Ixodidae*. C'est ainsi que l'on mit en évidence le rôle d'*Ixodes ricinus*, *Hæmaphysalis cinnabarinapunctata*, *Boophilus annulatus*, *B. decoloratus*, *Hyalomma dromedarii asiaticum*, *H. mauritanicum*, *Rhipicephalus simus*, *R. capensis*, *R. evertsi*, *R. appendiculatus*, *R. niveus* dans la transmission des piroplasmoses des bovidés, de *Dermacentor marginatus* et *D. niveus* dans la transmission de la piroplasmose des chevaux (la première espèce transmet, en outre, la piroplasmose des chiens), de *Rhipicephalus bursa* dans la transmission des piroplasmoses des moutons et des chèvres, et enfin de *Rhipicephalus sanguineus* dans la transmission de la piroplasmose des chiens (transmise aussi par *Hæmaphysalis leachi*). Les tiques du genre *Boophilus* sont capables, en outre, de transmettre un spirochète des bovidés, *Spirochæta theileri*.

Les tiques de la famille des *Argasidæ* comprennent seulement deux genres : *Argas* et *Ornithodoros*, reconnus comme vecteurs des spirochétoses des oiseaux et de l'homme. *Argas persicus*, *A. miniatus*, *A. reflexus* et *A. victiriensis* transmettent la spirochétose des poules (*Spirochæta gallinarum*) et des oies (*S. anserinum*) ; *Ornithodoros moubata*, *O. savignyi*, *O. venezuelensis*, *O. talaje*, *O. maroccanus* et *O. tholozani* transmettent

la fièvre récurrente de l'homme, causée par différents spirochètes. De plus, expérimentalement, quelques tiques, *Ornithodoros lahorensis* par exemple, peuvent transmettre des trypanosomoses (surra aux Indes).

Nos expériences effectuées en 1934 avec des tiques des moutons envoyées d'Azérbaischan (Transcaucasie) jettent un nouveau jour sur cette question.

\* \* \*

On a vu que les tiques du genre *Ornithodoros* transmettent la fièvre récurrente de l'homme. *Ornithodoros moubata* et *O. savignyi* transmettent *Spirochæta duttoni* dans l'Afrique tropicale et l'Afrique portugaise orientale, mais qu'elles peuvent en outre transmettre expérimentalement *Trypanosoma cruzi* (Brumpt). L'*Ornithodoros venezuelensis* et l'*O. talaje* sont les vecteurs de la fièvre récurrente de l'homme, provoquée par *Treponema venezuelensis* au Vénézuéla, en Colombie et à Panama. *Ornithodoros marocanus* transmet en Espagne la fièvre récurrente, provoquée par *Treponema hispanicum*. *Ornithodoros crossi* peut transmettre mécaniquement le surra des animaux et cette même maladie est transmissible expérimentalement par *Ornithodoros lahorensis*. Quant à la transmission de *Spirochæta persica*, elle restait en discussion. Dschounkowsky (1912) accuse l'*Ornithodoros tholozani* d'en être le vecteur. Mais, à en juger d'après les photographies qu'il donna dans son travail, il s'agissait de l'*Ornithodoros lahorensis* (Nuttall). Pawlowsky prend comme vecteur de ce parasite *Ornithodoros talaje*, mais Brumpt nie la présence de celui-ci au Turkestan. Latyscheff (1925) constate expérimentalement qu'*Ornithodoros lahorensis* et Moskwine (1927) qu'*O. papillipes* transmettent en Asie centrale la fièvre récurrente humaine.

D'autre part, les tiques de l'espèce *Ornithodoros coniceps* se nourrissent sur les pigeons, mais, faute de pigeons, s'alimentent sur l'homme. *Ornithodoros rostratus* se rencontre sur les mammifères et les oiseaux, *Ornithodoros tholozani* se trouve, en Perse et aux Indes, dans les volières et dans les bergeries. En Russie (U. R. S. S.), *Ornithodoros lahorensis*, à son stade nymphal, parasite particulièrement les moutons (Dschounkowsky,

Pawlowsky, etc.). On attribue souvent aux tiques du genre *Ornithodoros*, qui se rencontrent sur les moutons, le pouvoir de provoquer une maladie mortelle (Oleneff) et, bien antérieurement déjà, on considérait les moutons ayant des *Ornithodores* comme susceptibles de propager les agents de la fièvre récurrente de l'homme (Dschounkowsky).

Nous apportons une solution plus détaillée à cette question du rôle de l'*Ornithodoros* dans la mortalité de nos moutons dans une expérience faite avec des tiques de « cochards » en Transcaucasie [1934] (1).

#### RECHERCHES PERSONNELLES.

*a) LES TIQUES DES « COCHARDS ».* — Un étudiant de l'École vétérinaire d'Eriwan (Arménie), M. Episkoposoff, envoya de Transcaucasie, le 4 février 1934, à la chaire de Parasitologie de l'École vétérinaire de Léningrad, des tiques des « cochards ». Ces tiques étaient récoltées sur des moutons du village de Koutschy (Azerbaidschan) des « cochards » du rayon de Kasoum-Ismailov (basse contrée). Une lettre les accompagnait, disant que ces tiques apparaissaient sur les moutons pendant qu'on les gardait dans les bergeries et disparaissaient des moutons dès leur sortie pour les pâturages des montagnes. Il est facile de découvrir les tiques dans les fentes des murs, des planchers et sous les débris de construction des cochards. Les vieux éleveurs de moutons avaient remarqué que, lorsque les tiques de cochards envahissaient en masse les moutons, ceux-ci mouraient vite. Durant cet hiver, les moutons des domaines d'État de Mouchaba et de Mirzik et des « kolkhoses » (villages collectivisés), en ont souffert; à côté d'eux, se trouvaient les moutons du kolkhose du village de Koutschy et ce kolkhose ayant construit, pour ses moutons, de nouveaux cochards, évita ainsi la mortalité. Selon les éleveurs de moutons, il n'y a pas de maladie dans les nouveaux cochards pendant deux ans et ce n'est que dans la troisième année qu'apparaît la mortalité. Cette observation des anciens a une grande

(1) On nomme « cochards » un réduit pour les moutons, creusé dans la terre et couvert avec une toiture. Les murs, planchers et toits sont en bois de « karagatsche ».

importance. Dans les maladies des moutons, les stades de développement de la tique jouent incontestablement un grand rôle.

L'Institut des recherches scientifiques vétérinaires de Zouranbade a fait sur les moutons du kolkhose de Mirzik des essais en grand pour combattre les tiques des cochards à l'aide de liquides. Le résultat fut favorable, quoique cette méthode soit fort compliquée. Les tiques se fixent principalement des deux côtés de l'épine dorsale, sur la partie supérieure de la queue, en avant des omoplates et sur le cou.

*b) CONSERVATION DES TIQUES DE COCHARDS AU LABORATOIRE.* — En examinant, au laboratoire, les tiques de cochards, on trouva qu'elles appartenaient à l'espèce *Ornithodoros lahorensis*, Neumann (1908). Elles étaient au nombre de huit : deux au stade adulte et six au stade nymphal (à la dernière mue, à en juger d'après leurs dimensions, qui ne diffèrent pas beaucoup des stades adultes). On les garda au laboratoire, à une température de 15-17° C, dans une éprouvette recouverte. Jusqu'au 4 avril 1934, les tiques restèrent à jeun.

*c) INFECTION DU CHEVREAU PAR LES TIQUES DE COCHARDS :*

Le 5 avril 1934 : température 39°7. Pouls, 88-100. Respiration, 36-40. Urine et excréments normaux. Sur les frottis du sang périphérique : anisocytose, poikilocytose, cellules géantes pointillées et corps de Jolly.

Le 6 avril : température 39°5. Pouls, 100. Respiration, 36-40. Même aspect du sang périphérique.

Le 9 avril : température 36°5. Pouls, 100. Respiration, 36-40. Même tableau du sang ; Hb. 80 p. 100. Erythrocytes : 17.280.000. Leucocytes : 9.700.

Le 11 avril : Température 39°5. A 8 heures du soir, on place sur l'oreille gauche du chevreau quatre tiques (*Ornithodoros lahorensis*) : deux au stade adulte et deux nymphes. Elles se fixent à la peau de l'oreille et y restent pendant leur repas de sang. Deux tiques se nourrissent pendant cinq minutes et deux pendant dix minutes. Leurs dimensions s'accroissent de trois à six fois, puis elles s'en vont. Leur poids augmente de deux, trois et cinq fois.

*d) HISTOIRE DE LA MALADIE :*

Le 12 avril : température 39°5. Sur les frottis de sang : anisocytose et poikilocytose.

Le 13 avril : température 39°3. Même aspect du sang.

Le 14 avril : température 39°3. Pouls, 88. Respiration, 32. Même aspect du sang.

Le 15 avril : température 39°3 le matin, 39°8 le soir. L'aspect du sang est le même.

Le 16 avril : température 39°3. Pour la première fois, sur les frottis du sang périphérique, *Anaplasma ovis* en position centrale dans des macrocytes.

Le 17 avril : température 39°5. Anisocytose, poïkilocytose, cellules géantes pointillées, corps de Jolly et *Anaplasma ovis* dans des macrocytes (également en position centrale).

Le 18 avril : température 39°7. Anisocytose, poïkilocytose et *Anaplasma ovis* dans des macrocytes (en position centrale).

19 avril : température, 39°3 le matin et 39°8 le soir. Même tableau du sang.

20 avril : température, 39°3. Même tableau du sang.

21 avril : température, 39°5. Anisocytose, cellules géantes pointillées, corps de Jolly, *Anaplasma ovis* et des anneaux endoglobulaires indistincts.

22 avril : température, 38°7. Mêmes constatations.

23 avril : température, 38°9. Forte anisocytose, poïkilocytose et *Anaplasma ovis*.

24 avril : 41° le matin et 40°4 le soir. Rares *Anaplasma ovis*. Le chevreau se tient tranquille.

25 avril : température, 40°. Anisocytose, poïkylocytose et *Anaplasma ovis*. Le chevreau est plutôt triste.

26 avril : température, 39°3 le matin et 39°7 le soir. Anisocytose, poïkilocytose et *Anaplasma ovis*. L'état général du chevreau est mauvais. Il a beaucoup maigrì.

27 avril : température, 37°3 le matin et 39°7 le soir. Le chevreau est d'une maigreur effrayante, il ne tient plus debout. Diarrhée ; l'examen microscopique des excréments ne montre rien. Dans le sang, *Anaplasma ovis*, anisocytose et poïkilocytose.

28 avril : température, 38°7. Pas de changement. Forte diarrhée. Anisocytose, poïkilocytose et *Anaplasma ovis*. Le soir, température 39°5. Une ponction fut faite du ganglion précapsulaire ; sur les frottis du suc ganglionnaire, beaucoup de « formes en grenades » suspectes, mais non distinctes.

29 avril : température, 39°2 le matin et 40° le soir. Diarrhée. Anisocytose, poïkilocytose et *Anaplasma ovis*.

30 avril : température, 39°2 le matin et 39°5 le soir. Le tableau du sang est le même.

1<sup>er</sup> mai : température, 39° le matin et 39°2 le soir. Anisocytose, poïkilocytose, polychromatophilie, très rares cellules géantes pointillées, corps de Jolly et *Anaplasma ovis*.

2 mai : température, 38°8 le matin et 40° le soir. Même tableau du sang ; en outre, des anneaux endoglobulaires indistincts.

3 mai : température, 39°3 le matin et 38°8 le soir. Anisocytose, poïkilocytose, corps de Jolly, *Anaplasma ovis* et des anneaux endoglobulaires indistincts. Pendant la journée, l'urine est rouge pendant deux à trois heures.

4 mai : température, 37° le matin et 39°3 le soir. Le chevreau est triste. Pendant quelques heures, l'urine est rouge. Anisocytose, poïkilocytose, *Anaplasma ovis* et des anneaux endoglobulaires indistincts.

5 mai : température, 37°5 le matin et 39°5 le soir. Même tableau du sang.

7 mai : température, 37°5 le matin et 39°4 le soir. Même tableau du sang.

8 mai : température, 37°2 le matin et 39° le soir. Même tableau du sang.

9 mai : température, 36°5 et 39°2 le soir. Le chevreau est fort affaibli. Même tableau du sang. Hémoglobine, 40 p. 100. Erythrocytes, 12.168.000. Leucocytes, 6.100.

10 mai : température, 38°2 le matin et 40° le soir. Présence d'anneaux endoglobulaires distincts, quoique rares.

11 mai : température, 38°2 le matin et 39°5 le soir. Même tableau du sang.

12 mai : température, 37°5 le matin et 39°7 le soir. Même tableau du sang.

13 mai : température, 37°9 le matin et 39°8 le soir. Même tableau du sang.

14 mai : température, 37°4 le matin et 39°3 le soir. Aucun changement.

15 mai : température, 38°7 le matin et 38°8 le soir. Forte anisocytose, poïkylocytose, *Anaplasma ovis* et anneaux endoglobulaires. Le soir, à 7 heures, deux nymphes d'*Ornithodoros lahorensis*, déposées sur le chevreau, se gorgent.

16 mai : température, 37°5 le matin et 39°8 le soir. Dans le sang, peu de polychromatophiles, anisocytose et poïkilocytose.

17 mai : température, 38°2 le matin et 39°8 le soir. L'urine est plus claire (couleur de vin de Porto), limpide. Anisocytose, poïkilocytose, cellules géantes pointillées, polychromatophilie, corps de Jolly et *Anaplasma ovis*.

18 mai : température, 37°2 le matin et 39°5 le soir. Urine claire. Même tableau du sang.

19 mai : température, 38°2 le matin et 39°5 le soir. Même tableau du sang (présence encore d'anneaux endoglobulaires).

20 mai : température, 38°3 le matin et 39°2 le soir. Dans le sang, *Anaplasma ovis* fréquents, cellules géantes pointillées, forte poïkilocytose, anisocytose, corps de Jolly et lymphocytose.

21 mai : température, 38°7 le matin et 39°2 le soir. Même tableau du sang.

22 mai : température, 36°5 le matin et 39°7 le soir. L'urine est rouge. Hémoglobine, 38 p. 100. Érythrocytes, 12.040.000. Leucocytes, 9.600. Même tableau du sang.

23 mai : température, 36°3 le matin, 39°6 le jour et 38°8 le soir. Même tableau du sang, en plus, cellules de Türk et anneaux endoglobulaires. L'urine est rouge. Le chevreau est oppressé.

24 mai : température, 35°6 le matin, 34° le jour et 39°4 le soir. Pouls, 200, accéléré. Le chevreau est faible. L'urine est claire. Point d'hémoparasites. Anisocytose, poïkylocytose, cellules géantes pointillées nombreuses.

25 mai : température, 36° le matin. Pouls, 100, intermittent. Etat général sans changement. Urine claire. Dans le sang, anisocytose, poïkylocytose, corps de Jolly, normoblastes et rares anneaux endoglobulaires. Température, 33°6 le jour. Pouls, 62, faible. Respiration, 28-32. Le chevreau ne tient pas debout. À 4 heures du soir : hémoglobine, 35 p. 100, érythrocytes, 8.368.000, leucocytes, 9.000. Le sang se coagule mal, reste liquide. L'agonie commence à 3 heures et le chevreau meurt à 5 heures.

Le tableau anatomo-pathologique montre un épuisement grave. Muqueuses fort anémiques, muscles pâles. Les organes parenchymateux sont hyperémiés, particulièrement le foie, qui est légèrement hypertrophié et brun jaunâtre. La vésicule biliaire est pleine de bile jaunâtre et visqueuse; extérieurement, elle est recouverte d'une couche gélatineuse. La rate est hypertrophiée, surtout en son milieu; longue de 5 centimètres, large de 3 centimètres, sa pulpe est plutôt molle. Les reins sont

anémiques, les couches corticales et médullaires se distinguent nettement ; la capsule se décortique.

Les capsules surrénales sont agrandies, succulentes et molles, longues de 2 centimètres, larges de 1 centimètre. Les ganglions précapsulaires sont succulents (longs de 2 centimètres et larges de 1 centimètre). Le rumen est rempli de masses alimentaires liquides. L'intestin grêle est gonflé et le rectum présente de petites hémorragies. Sur la muqueuse de la vessie, il y a aussi de petites hémorragies. L'urine est claire. La moelle des os est rouge et liquide. Les poumons sont anémiques. Le cœur a des hémorragies insignifiantes sur l'endocarde et en très petit nombre ; le muscle cardiaque est plutôt friable.

L'examen microscopique des frottis de moelle osseuse démontre des formes distinctes de corps en grenades (corps de Koch, Plasmakugel, blue bodies), mais en petit nombre. On observe aussi des formes distinctes, mais en très petit nombre, sur les frottis du foie et des ganglions lymphatiques. Dimensions de ces corps en grenades 14,4-18  $\mu$ , dimensions des granules, 0,5-0,9  $\mu$ ). Les formes isolées étaient les plus fréquentes. Il y a des agamontes, ainsi que des gamontes. L'ensemencement sur des milieux nutritifs n'a rien donné.

#### EXAMEN DES URINES :

Urine du 17 mai : présence d'albumine (réaction de Spiegler). Présence d'hémoglobine fortement augmentée. Dans le culot, restes d'érythrocytes, leucocytes en petit nombre et cristaux de sulfate de chaux.

Urine du 18 mai : albumine, hémoglobine. Dans le culot, restes d'érythrocytes et sulfate de chaux.

Urine du 22 mai : albumine (réaction de Roch et Spiegler); l'hémoglobine (d'après van Deen), surpassait de beaucoup la normale; dans le culot, restes d'érythrocytes et sulfate de chaux.

Urine du 23 mai : albumine et hémoglobine. Dans le culot, restes d'érythrocytes.

#### CONCLUSIONS.

Tout ce qui a été dit ci-dessus prouve que l'*Ornithodoros lahorensis* est capable, contrairement à l'opinion admise, de transmettre des hémoparasites. Dans notre expérience sur ce chevreau, durant toute sa maladie, on a nettement constaté la présence d'*Anaplasma ovis*, dans le sang, en faisant le diagnostic différentiel des anaplasmes avec les corps de Jolly. La

présence des anaplasmes est constatée non seulement à l'examen microscopique des frottis de sang périphérique, mais aussi grâce aux changements quantitatifs du sang, avec baisse du pourcentage de l'hémoglobine. Avant de tomber malade (2 avril), le chevreau avait Hb. 80 p. 100 et 17.280.000 érythrocytes par centimètre cube; après un mois (9 mai) il n'y avait que Hb. 40 p. 100 et 12.168.000 érythrocytes; le jour de sa mort (25 mai), il n'y avait que Hb. 35 p. 100 et 8.368.000 érythrocytes. Outre *Anaplasma ovis*, on rencontre, quoique rarement, sur les frottis de sang périphérique, des anneaux endoglobulaires indistincts ou des anneaux bien distincts. Il est risqué de tirer quelque conclusion d'après les formes annulaires; mais vu la présence des corps en grenades (corps de Koch) dans la moelle des os, le foie et les ganglions lymphatiques, on peut affirmer, sans hésitation, que nous avons affaire ici à une gondériose causée par *Theileria recondita*, ou bien à une theilériose provoquée par *Theileria ovis*.

Nous présumons avoir eu affaire à *Theileria recondita*, vu la grande rareté des formes annulaires endoglobulaires du parasite dans le sang périphérique. La présence des corps de Koch chez *Theileria recondita* a déjà été observée par quelques auteurs (Ed. Sergent, Markoff et par nous).

Contre *Theileria ovis*, nous avons les motifs suivants : insignifiant pourcentage d'infection des érythrocytes en général, et nombre des parasites dans les érythrocytes ne dépassant pas deux, et ceci même très rarement.

La mort du chevreau parle contre la gondériose, car on n'a pas observé de mort par gondériose. Notre cas de gondériose s'est compliqué d'anaplasmose.

#### RÉSUMÉ.

1° L'*Ornithodoros lahorensis* est capable de transmettre l'*Anaplasma ovis*.

2° L'*Ornithodoros lahorensis* peut transmettre des hémoparasites, se caractérisant par la présence de corps de Koch dans leur développement (*Theileria recondita* ou *Theileria ovis*).

J'exprime ma vive reconnaissance à M. le professeur Dr W. L. Yakimoff pour le concours qu'il m'a apporté dans ce travail; à

l'assistant de la Chaire de diagnostic, M. le médecin-vétérinaire N. I. Kouïlakoff et à l'étudiant de l'Ecole vétérinaire d'Erivan P. Episkoposoff.

## BIBLIOGRAPHIE

- BRUMPT (E.). *Bull. de la Soc. de Path. exotique*, 1908, p. 557; *Précis de Parasitologie*, 1927, Paris, Masson, éditeur.
- DSCHOUNKOWSKY (E. P.). *Medizinskoé Obosrenié* (en russe), n° 10, 1927.
- KRITSCHEWSKY (I. L.) et DVOLOITSKAYA (K. M.). *Zentralb. f. Bakter.*, **121**, f. 7/8, p. 421-432, 1931.
- LATYSCHEFF (N. I.). *Bull. de la Soc. de Défense en Asie centrale*, n° 1, 1927 (en russe).
- MOSKWIN (J. A.). *Zeitschr. f. Parasit.*, **2**, H. 4, 1929.
- OLENEFF (N. O.). *Edit. de l'Acad. des Sciences*, Léningrad, 1931.
- PAWLOWSKY (E. N.). *Médic. Pensée de l'Ushékistan*, 1929 (en russe).
- SONTEIN (A. K.). *Médic. Pensée de l'Ubékistan*, **2**, n° 3, 1927 (en russe).
- PIKOUL (J. N.). *Journ. russe de Méd. trop.*, n° 6, 1928.
- TROITZSKY. *Journ. microbiol.*, **72**, n° 3, 1926 (en russe).

# LE RAYONNEMENT MITOGÉNÉTIQUE

CONFÉRENCE

de M. le Professeur GOURVITCH, à l'Institut Pasteur.

Les belles recherches de M. et M<sup>me</sup> Magrou, issues de cette Maison, me dispensent de sacrifier trop de temps à un exposé tout à fait élémentaire du rayonnement mitogénétique; et ce n'est qu'une certaine mise au point de nos nouvelles méthodes que je dois faire en premier lieu pour permettre de comprendre ce qui va suivre.

Je suppose que l'action mitogénétique primordiale est bien connue. Il s'agit d'une stimulation prononcée de la multiplication des cellules. Quant à l'agent mitogénétique, sa nature a été définie par deux voies différentes, l'une purement biologique, l'autre physique. Devant un spectrographe à prisme de quartz, muni d'une échelle des longueurs d'onde indiquant la position des rayons ultra-violets, plaçons une source que nous supposons capable d'émettre des rayons mitogénétiques; devant la fente de ce spectrographe exposons un détecteur approprié; si ce détecteur réagit par un effet mitogénétique, il ne peut s'agir d'autre chose que d'un rayonnement ultra-violet. Cette expérience d'analyse spectrale ayant été réalisée, je pense que la nature des rayons mitogénétiques a été prouvée d'une façon tout à fait stricte.

D'autre part, les physiciens de divers pays, entre autres M. Audubert à Paris, au moyen d'un dispositif purement physique, inspiré du compteur de Geiger, ont prouvé qu'il s'agit d'ultra-violet d'assez courte longueur d'onde. En somme, nous savons maintenant très bien que l'agent mitogénétique est un rayonnement ultra-violet très faible dont la longueur d'onde est comprise entre 1.900 et 2.500 angströms.

Le contrôle définitif a été donné par un autre moyen : on prend une source physique d'ultra-violet telle que l'arc de mercure; on en fait passer la lumière par un spectrographe en quartz et l'on expose les détecteurs biologiques à certaines raies du spectre. On constate que seules les raies comprises dans l'intervalle indiqué plus haut ont une action mitogénétique.

On peut donc tirer la conclusion suivante : les organismes sont sensibles aux mêmes longueurs d'ondes qu'ils émettent eux-mêmes. C'est un principe qui est tout à fait clair.

Pour prouver l'existence du rayonnement mitogénétique, les biologistes doivent recourir aux détecteurs biologiques, puisque les

méthodes physiques sont beaucoup trop délicates pour être à la disposition des biologistes.

Nous nous servons tant de détecteurs animaux que de détecteurs végétaux; ce sont surtout des détecteurs végétaux qui sont employés: les bactéries et les levures.

La méthode des bactéries est assez délicate, elle exige le concours d'un bactériologiste consommé et c'est surtout M. le Professeur Wolff, à Utrecht, qui en fait usage. Quant à nous, dans les laboratoires de Leningrad, de Moscou et ailleurs en Russie, nous prenons toujours des levures, plus faciles à manier.

Les levures peuvent être prises soit sur gélose, soit en milieu liquide comme le moût de bière.

Dans le premier cas, on prélève un fragment de 1 cent. carré d'une culture de levures sur plaque de gélose, on le divise en deux, une moitié restant comme témoin et l'autre moitié étant soumise à l'induction mitogénétique. Après une exposition appropriée de cinq minutes, on place les deux blocs à l'étuve pendant une heure et demie, puis on fait des frottis et on dénombre les petits bourgeons d'un ordre de grandeur bien défini; c'est ainsi qu'un petit bourgeon rond sera compté comme un bourgeon, alors qu'un bourgeon plus grand sera déjà compté comme une vraie cellule.

A première vue, ce procédé paraît un peu arbitraire. Il exige, en effet, une assez longue expérience. Dans notre laboratoire, l'apprentissage dure un mois, même six semaines, mais après qu'on l'a une fois en main, la méthode donne d'excellents résultats.

Pour nous mettre à l'abri des influences d'ordre psychique, nous comptons toujours à l'aveuglette; les préparations sont numérotées, et celui qui procède à la numération ignore s'il a affaire à des levures témoins ou à des levures exposées.

Ce travail de numération est très pénible, un autre procédé plus facile consiste à employer des levures en milieu liquide, en moût de bière, par exemple. On fait usage de deux tubes d'à peu près 3 à 4 millimètres de largeur et on introduit une suspension de levures en fermentation, par exemple une culture de douze heures à peu près. L'un de ces tubes sert de témoin, l'autre sera soumis à l'induction.

L'expérience faite, on prélève de chaque tube, avec une pipette graduée, une quantité strictement définie, par exemple 0 c. c. 02, on la transporte dans de petites éprouvettes, on y ajoute 1 cent. cube de moût de bière. On les ferme et on les met à l'étuve pendant au moins quatre heures (un séjour à l'étuve de douze heures est préférable). Après cela, on les tue avec une même quantité d'acide sulfurique, puis l'on procède à l'examen.

Le procédé le plus simple, qui donne de très bons résultats, consiste à compter non plus les bourgeons, mais le nombre total des cellules contenues dans un même volume des deux cultures témoins

et exposées. On peut aussi faire usage d'un néphélosomètre. Enfin, on peut employer des tubes qui sont calqués sur les mélangeurs en usage dans les numérations sanguines. On introduit des quantités égales de chaque culture dans deux de ces ampoules, qui sont rigoureusement calibrées. Puis on scelle les tubes avec une cire quelconque, on centrifuge, et, après cinq minutes de centrifugation, on voit dans le tube induit, une colonne de levures dont la hauteur dépasse de 30 à 40 p. 100, la hauteur de la colonne de levures du tube témoin.

Dans les expériences où aucune des deux parties n'a été soumise à l'induction, les deux colonnes de levures sont sensiblement égales, ce qui prouve la valeur de la méthode.

Cette méthode est tout à fait objective et assez facile à manier. J'ai dit assez facile parce que cela exige aussi un apprentissage de quelques semaines.

Je crois que cet exposé des méthodes suffit pour permettre de comprendre ce qui va suivre.

Pour une étude quelque peu approfondie nous faisons maintenant en général usage de l'analyse mitogénétique spectrale. C'est ainsi que dans le cas du sang, par exemple, ce n'est pas le fait brut qui nous occupe, mais surtout de savoir de quelle source le rayonnement est surgi. Nous supposons au début de nos recherches, qu'il pouvait s'agir de certaines fermentations ; c'est ainsi que nous avons étudié les principaux ferment qui interviennent dans notre métabolisme et dont nous avons une liste assez longue.

Nous avons établi les spectres mitogénétiques d'émission de réactions purement chimiques et de réactions produites par des ferment tels que l'enzyme glycolytique, la phosphatase, la créatine-phosphatase, une protéase, la maltase, la sucrase et l'uréase. En somme, ce sont sept ferment différents et si vous les comparez, vous verrez qu'en général les spectres sont différents.

Examinons maintenant les processus sur le vivant. C'est surtout le rayonnement du sang qui va nous occuper.

Pour étudier le rayonnement du sang nous pourrons recourir tant au sang circulant dans les veines qu'au sang extrait du corps et même hémolysé.

Pour le premier examen, ce sont de petits animaux qui sont le plus favorables. On peut prendre la veine abdominale de la grenouille ou la veine saphène du lapin, qui est assez transparente pour donner un spectre complet.

En examinant le spectre du rayonnement du sang, nous voyons que plusieurs réactions chimiques sont en jeu. Ce n'était pas douteux, mais il était intéressant de pouvoir montrer que, par exemple, un processus comme la dissociation de l'acide créatine-phosphorique a lieu dans le sang circulant, ce qui n'était pas prouvé par la chimie.

Procédons maintenant à un examen plus approfondi de ce que

nous savons sur le rayonnement du sang. Ce phénomène est tout à fait universel ; la statistique, tant chez nous que dans plusieurs laboratoires allemands et italiens, porte sur 3.000 ou 4.000 expériences au moins ; et l'on peut dire aujourd'hui que les animaux bien portants rayonnent toujours et que ce n'est que dans des maladies toutes spéciales que le rayonnement fait défaut.

La chose la plus curieuse et que nous concevons encore mal, c'est le fait que les maladies très graves, telles que la tuberculose, la syphilis, la pneumonie, le typhus, la plupart des maladies infectieuses n'altèrent aucunement le rayonnement du sang. Au contraire, les maladies du sang proprement dites, l'anémie pernicieuse, la leucémie, suppriment tout à fait le rayonnement du sang ; mais ce sont surtout les cancers qui sont toujours suivis d'un manque total de rayonnement.

La statistique du cancer n'est pas encore très grande, mais si l'on compare les 200 ou 250 cas qui ont été examinés dans divers laboratoires, en même temps que plusieurs milliers de cas contraires, c'est-à-dire se rapportant à diverses autres malades et à des sujets sains, on peut dire que le manque de rayonnement des cancéreux paraît être vraiment un fait tout à fait typique et constant.

Nous ne sommes pas des cliniciens, c'est pour cela qu'après vous avoir assuré que le fait existe, nous n'avons pas, personnellement, suivi la question plus loin. Mais c'est surtout dans deux cliniques allemandes, à la Charité de Berlin et dans la clinique de Francfort que l'on s'est beaucoup occupé de cette question. On avait des malades à sa disposition, on pouvait faire des autopsies, on pouvait suivre les cas dans les opérations, et la statistique allemande est tout à fait exacte et nette : elle porte en tout sur plus de 300 ou 400 sujets divers comprenant une centaine de cancéreux, et la méthode n'a jamais été en défaut. Dans tous les cas de cancers vérifiés par autopsie ou opération, le rayonnement manquait totalement. Il semble même que ce soit un phénomène assez précoce. Nous l'avons trouvé dans le cancer expérimental des souris blanches (cancer d'Ehrlich). Après l'inoculation, on étudie le rayonnement du sang de la souris tous les jours et on trouve jusqu'au sixième jour que le sang rayonne. A partir du sixième ou septième jour, on voit un manque total de rayonnement, le sang ne rayonne plus, et c'est seulement à partir du huitième ou du dixième jour que la petite tumeur apparaît sous le doigt. Donc, dans le cas du cancer expérimental tout au moins, on peut dire que le manque de rayonnement est un symptôme très précoce.

Je n'oserai dire qu'il en est de même chez l'homme ; il faut une longue étude clinique qui n'est pas de notre compétence, pour pouvoir affirmer si cette réaction a de l'avenir pour la clinique. Les statistiques allemandes sont assez optimistes, mais je n'ai pas d'expérience personnelle à ce sujet.

Vous voyez donc que le rayonnement du sang est un fait tout à fait constant, qu'il persiste même dans certaines maladies très graves et qu'il disparaît dans d'autres, en particulier dans le cancer. C'est là une chose qui choque à première vue. Nous allons voir qu'on peut avoir un peu de clarté là-dessus, sans prétendre à donner une explication totale de ce fait.

Quand je dis que le sang d'un homme bien portant ou même d'un homme malade, rayonne, c'est sous réserve que plusieurs conditions soient réalisées : le sujet ne doit pas être tout à fait à jeun, et c'est seulement, par exemple, une heure ou deux heures après un déjeuner que l'on doit prélever le sang ; il ne doit pas non plus être fatigué. On a fait une série d'expériences qui intéressent la physiologie du travail, dont on s'occupe maintenant chez nous, en Russie : on a étudié le sang des travailleurs dans diverses usines, par exemple dans une usine électrique. On prélève le sang le matin après le déjeuner, avant le travail, puis chez les mêmes individus après sept heures d'un travail non épuisant. Après sept heures de travail, le rayonnement du sang fait défaut. Après une heure ou deux de repos, il réapparaît de nouveau. Cette expérience a été faite dans plusieurs instituts de Léningrad et de Moscou et a donné des résultats concordants.

Vous voyez donc que, d'un côté, un tuberculeux qui est tout à fait épuisé, rayonne encore pour ainsi dire, alors qu'un homme bien portant qui a travaillé sept ou huit heures, perd son rayonnement pour une ou deux heures. Il y a là un fait qui n'est pas tout à fait clair.

Comment expliquer la disparition d'un rayonnement chez un individu bien portant, disparition qui ne dure qu'une ou deux heures ? Quelques recherches, qui datent de l'année dernière, nous donnent une idée générale de ce dont il s'agit.

Il n'est pas correct de dire que le rayonnement manque. Les processus fermentaires qui en sont la source ont lieu aussi bien dans le sang cancéreux que dans le sang normal. Mais le rayonnement émis est absorbé complètement par certaines substances qui se trouvent dans le sang cancéreux. Si vous inoculez aux souris ou aux rats de toutes petites quantités d'autolysats stériles de foie ou de rein, vous voyez que dans un délai de dix heures à peu près, le rayonnement fait défaut complètement et cela pour une durée d'un jour ou deux.

Il ne s'agit pas en ce cas d'un trouble du métabolisme, mais bien de la présence de matières en toutes petites quantités qui absorbent le rayonnement.

Il n'est pas douteux aussi que le manque de rayonnement, en cas de cancer, est dû à une absorption interne. Mais nous ignorons complètement quelles sont les matières absorbantes.

Je voudrais maintenant passer à un autre sujet qui est relié au précédent, c'est le problème du cancer. Nous avons déjà songé, depuis

longtemps, que si le rayonnement mitogénétique a un rapport avec la division cellulaire, c'est surtout le cancer qui doit nous intéresser en premier lieu. Et, en effet, il y a déjà cinq ou six ans de cela, qu'indépendamment de nous deux auteurs allemands ont prouvé la même chose que nous, à savoir que le cancer est une source de rayonnement très intense, peut-être une des plus intenses de notre corps, tandis que les tumeurs bénignes ne le sont pas ou le sont d'une façon assez faible.

Le rayonnement du cancer a certains caractères qui sont très intéressants. Les tissus cancéreux ne sont pas les seuls qui rayonnent. Il existe un rayonnement des muscles, des nerfs, des ganglions lymphatiques, de la moelle des os. L'objet à observer le plus commode est la cornée de notre œil. Vous savez, sans doute, que la cornée est très riche en mitoses; c'est un méristème permanent. Or, on constate qu'elle émet toujours un rayonnement assez intense.

Il était d'un intérêt particulier de comparer deux méristèmes : un normal qui est la cornée, et un méristème pathologique qui est le cancer. Est-ce que le rayonnement mitogénétique est le même, ou est-ce qu'il y a des différences marquées? On a pu prouver que les différences sont tout à fait capitales portant sur le fond même des choses.

On peut dire, en général, que le rayonnement de nos méristèmes physiologiques n'est pas autonome et relève du sang, tandis que le rayonnement du cancer est tout à fait autonome. La cellule cancéreuse, privée de sang, n'en rayonne pas moins, tandis que si vous étudiez le rayonnement de l'œil vivant et si vous sacrifiez l'animal pendant votre expérience, vous voyez que le rayonnement disparaît et d'une façon définitive. Par conséquent, le rayonnement de la cornée n'est dû qu'à son séjour dans l'ambiance normale de l'organisme.

Il faut dire qu'à première vue, la même chose a lieu aussi avec le cancer. Si l'on prend un cancer de souris, un carcinome d'Ehrlich et qu'on fasse l'expérience sur l'animal vivant, après avoir mis la tumeur à nu en enlevant un morceau de peau, on constate que cette tumeur donne un rayonnement très fort. Il suffit, par exemple, d'une exposition de quarante secondes pour avoir déjà un effet très remarquable. Si, maintenant, pendant l'expérience, on sacrifie l'animal en lui coupant la tête, au bout d'une minute le rayonnement n'existe plus. Mais il suffit d'arroser la tumeur avec du liquide de Ringer glucosé pour que le rayonnement revienne. Ce fait est à rapprocher de ce que Warburg a prouvé pour le métabolisme du cancer : la glycolyse du cancer extirpé du corps est faible, à moins que l'on n'additionne la tumeur de glucose. Le rayonnement spontané du cancer réapparaît du reste après trente à quarante minutes. Il n'en est pas de même d'un œil extirpé de l'organisme, privé, par conséquent, de circulation sanguine. Il ne rayonne pas et nous n'avons trouvé aucun

moyen de le faire rayonner à nouveau. Tandis que, dans le cas du cancer, c'est seulement un manque de glucose qui est la cause de la cessation du rayonnement, dans l'œil, au contraire, le glucose n'y est pour rien : c'est la première preuve qu'il y a une différence marquée entre le rayonnement du cancer et le rayonnement de la cornée.

Si on expose un bloc de gélose supportant une culture de levure à une source de rayonnement biologique pouvant servir en même temps de détecteur, c'est une influence réciproque qui a lieu. Les deux rayonnements s'entrecroisent pour ainsi dire et nous trouvons un surcroît de mitoses de part et d'autre : c'est ce que nous appelons la muto-induction. Mais nous prolongeons l'expérience trop longtemps, nous trouvons habituellement un épuisement.

Si vous faites l'exposition avec l'œil vivant, vous trouvez qu'il s'épuise très vite. Si, par exemple, vous prolongez quinze minutes la durée de l'exposition en changeant trois fois les blocs de gélose (qui restent ainsi exposés chacun pendant cinq minutes), vous constatez que les derniers blocs de levures exposés ne sont plus influencés ; au bout de dix à quinze minutes, la cornée ne rayonne plus. Après une heure ou deux de repos, elle recommence à rayonner. Avec le cancer, au contraire, vous pouvez prolonger l'exposition aussi longtemps que vous le voulez, le rayonnement ne s'épuise jamais. C'est là une deuxième preuve que le rayonnement de la cornée et le rayonnement du cancer sont de nature différente.

Ces données étant acquises, nous avons eu l'idée de pénétrer un peu plus loin dans le métabolisme du cancer, en regardant s'il n'y a pas d'autres choses dans son régime mitogénétique qui le mette en situation toute spéciale. L'expérience montre qu'il en est ainsi. On sait que la cellule cancéreuse est beaucoup plus perméable que la cellule épithéliale normale. Nous l'avons prouvé par une méthode beaucoup plus élégante que les autres, parce qu'il s'agit d'une réaction si sensible qu'aucune analyse chimique ne peut la déceler.

On prélève une tumeur, par exemple une grande métastase dans le péritoine d'une souris. On choisit une tumeur se laissant énucléer sans aucune lésion et on la met pour une demi-heure dans une petite quantité de liquide de Ringer; on examine ensuite le liquide, qui reste tout à fait clair. On l'examine en lui ajoutant soit du glucose, soit de l'acide nucléinique, soit de l'albumine pour voir si le ferment qui était dans la tumeur a pénétré dans ce liquide. C'est précisément le cas : si on prend ce liquide où la tumeur a séjourné pendant une demi-heure, on voit que l'acide nucléinique a un rayonnement dû à l'action de la nucléinase et l'albumine un rayonnement dû à l'action de la protéase. Si on répète les expériences avec les organes normaux de souris (on peut prendre le foie ou la rate, ou le rein, on peut le prendre en entier ou coupé en tranches avec un rasoir bien effilé), on ne trouve rien. Un séjour d'une heure ou

de deux heures de ces organes dans la même solution de Ringer laisse ce liquide tout à fait intact, ne lui communique aucun pouvoir de rayonnement.

On en conclut que la perméabilité de la cellule cancéreuse est beaucoup plus grande que celle d'une cellule d'un tissu parenchymateux normal. Il s'ensuit que le cancer libère toujours des enzymes, qu'il y a un flux toujours remarquable de ferment dans l'ambiance de la cellule carcinomateuse. Et puisqu'en même temps cette ambiance est riche en matières qui peuvent être sujettes à l'action de ces ferment, il s'ensuit que toute cellule carcinomateuse vit dans une ambiance radiante pour ainsi dire, qu'un rayonnement a toujours lieu autour d'elle.

Nous passons maintenant à une question d'intérêt fondamental : quel rôle joue le régime mitogénétique dans la biologie de la cellule cancéreuse ?

Avant d'aborder ce problème, nous passerons en revue nos connaissances sur le régime mitogénétique de tissus normaux. Une étude comparée du comportement des éléments les plus différents, tels les bactéries et les levures d'une part, et les fibres nerveuses, la cornée et le foie de l'autre, conduit aux deux résultats d'ordre général suivants :

1<sup>o</sup> Une irradiation mitogénétique assez prolongée (de trente à quarante minutes pour les levures, de deux à trois heures pour les nerfs) aboutit à la dépression ou à l'épuisement, différents selon l'objet.

Pour les levures, c'est la multiplication des cellules (et le rayonnement) qui sont totalement supprimés pour un certain temps. La cornée subit une suppression complète du rayonnement. Les nerfs subissent l'état de « parabiose » (non-conductibilité), etc.

2<sup>o</sup> La perméabilité des cellules est sensiblement accrue (levures et foie). La preuve est donnée par un procédé très simple : le foie intact d'une souris, plongé dans le liquide de Ringer (4-5 cent. cubes) est irradié pendant quinze-vingt minutes et ensuite retiré du récipient. En ajoutant au liquide, qui reste tout à fait transparent, de petites quantités de glycose, de l'acide nucléique et de l'albumine, on provoque un rayonnement dont la composition spectrale correspond aux trois ferment respectifs de ces trois substances.

Les expériences témoins avec un séjour du foie dans le liquide, prolongé jusqu'à deux heures, donnent un résultat nul.

La cellule cancéreuse se comporte d'une autre façon : nos expériences variées semblent prouver qu'elle ne se laisse pas impressionner par l'irradiation externe, qu'elle dispose en d'autres termes d'une certaine *immunité mitogénétique*. Le fait que la multiplication cellulaire marche son train et ne tarit pas, malgré l'ambiance mitogénétique intense et ininterrompue, en est déjà une preuve. Mais ce sont surtout divers faits touchant le rayonnement mitogénétique tant primaire que secondaire qui démontrent que la cellule cancéreuse

est effectivement inaccessible à l'irradiation. Son rayonnement primaire persiste malgré une irradiation amplement suffisante pour le supprimer totalement dans tous les tissus normaux. D'autre part, dans l'état spécial où le rayonnement primaire fait défaut (la première demi-heure qui suit la décapitation), il n'y a pas moyen de provoquer un rayonnement secondaire des tissus cancéreux, tandis que nous ne connaissons pas de tissus parenchymateux qui, privés de la faculté du rayonnement primaire, se refuseraient à émettre un rayonnement secondaire.

Il serait trop long d'insister sur d'autres faits, un peu compliqués, qui viennent à l'appui de notre thèse. Je dois aussi me refuser à tenter ici une explication complète de ce fait d'une immunité mitogénétique, qui paraît à première vue si étrange. Il suffira de mentionner que les difficultés ne paraissent pas insurmontables, nos recherches récentes ayant montré que les pellicules très minces, même quasi-monomoléculaires, de certaines matières, comme les lipoïdes, suffisent déjà pour couper complètement le très faible rayonnement mitogénétique. On pourrait donc s'imaginer que de telles pellicules, répandues dans tous les éléments vivants, mais d'un arrangement spécial dans la cellule cancéreuse, la protègent de l'irradiation externe.

Mais d'où vient alors l'immense rayonnement issu de la cellule cancéreuse, puisque sa couche superficielle n'est pas transparente pour le rayonnement ?

La réponse à cette question très légitime paraîtra peut-être un peu hasardée, mais elle est basée sur des faits indéniables : les réactions fermentatives, qui sont à la base du rayonnement émis par la cellule cancéreuse, se déroulent à la surface même de la cellule ; d'autre part, le rayonnement profond, dû aux processus de métabolisme dans le sein de la cellule et intercepté par les pellicules absorbantes, ne nous devient accessible que dans des circonstances expérimentales spéciales, que nous ne mentionnerons pas ici.

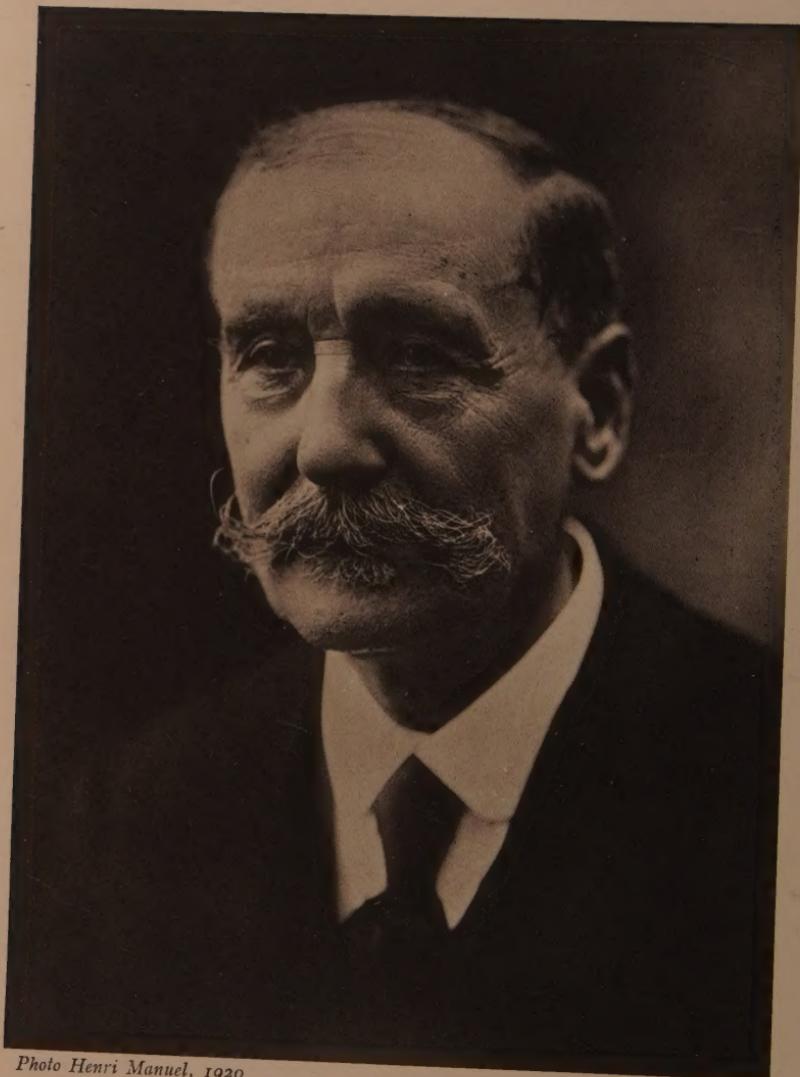
En revenant maintenant à notre point de départ, à savoir la question de la signification du régime mitogénétique pour la biologie du cancer, nous avons tout lieu d'admettre que, en ce qui concerne le deuxième point, c'est-à-dire l'accroissement de la perméabilité cellulaire (dans le sens de la diffusion), la cellule cancéreuse ne fait pas d'exception à la règle générale, c'est-à-dire que sa perméabilité excessive pour les ferment est, au moins en majeure partie, la suite de l'ambiance radiante permanente.

Je viens de passer en revue les faits principaux concernant les phénomènes mitogénétiques relatifs au cancer et j'ai essayé de mettre en lumière leur rôle biologique. L'avenir seul montrera si on peut en tirer quelques avantages pour ce grand problème.

*Le Gérant : G. MASSON.*







*B*  
Photo Henri Manuel, 1920

*Vaillard*

L. VAILLARD  
(1850-1935)